



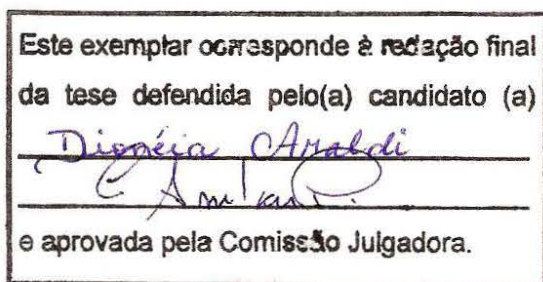
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

DIONÉIA ARALDI

**O Papel da Interleucina-1 β Produzida no Gânglio da
Raiz Dorsal no Desenvolvimento da Hiperalgesia
Inflamatória**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ar12p	Araldi, Dionéia, 1982- O papel da interleucina-1β produzida no gânglio da raiz dorsal no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória / Dionéia Araldi. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. Orientador: Carlos Amilcar Parada. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Hiperalgesia. 2. Gânglio da raiz dorsal. 3. Interleucina-1beta. 4. Receptores tipo I de interleucina-1. 5. Prostaglandina E2. I. Parada, Carlos Amilcar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: The role of dorsal root ganglion-produced interleukin-1 β in development of inflammatory hyperalgesia

Palavras-chave em Inglês:

Hyperalgesia

Dorsal root ganglion

Interleukin-1 beta

Interleukin-1 type I receptors

Prostaglandin E2

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Yara Cury

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Adilson Roberto Cardoso

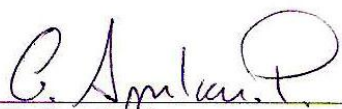
Data da defesa: 14-05-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

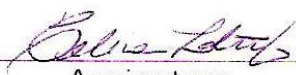
Campinas, 14 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo


Assinatura

Profa. Dra. Yara Cury


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira
Fusaro


Assinatura

Prof. Dr. Adilson Roberto Cardoso


Assinatura

Prof. Dr. Fábio Rogério


Assinatura

Profa. Dra. Nara Lins Meira Quintão


Assinatura

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari


Assinatura

Pra o Meu Consumo
Gujo Teixeira e Luiz Marengo

Têm coisas que tem seu valor
Avaliado em quilates, em cifras e fins
E outras não têm o apreço
Nem pagam o preço que valem pra mim

Tenho uma velha saudade
Que levo comigo por ser companheira
E que aos olhos dos outros
Parecem desgostos por ser tão caseira

Não deixo as coisas que eu gosto
Perdidas aos olhos de quem procurar
Mas olho o mundo na volta
Achando outra coisa que eu possa gostar
Tenho amigos que o tempo
Por ser indelével, jamais separou
E ao mesmo tempo revejo
As marcas de ausência que ele me deixou..

Carrego nas costas meu mundo
E junto umas coisas que me fazem bem
Fazendo da minha janela
Imenso horizonte, como me convém

Daz vozes dos outros eu levo a palavra
Dos sonhos dos outros eu tiro a razão
Dos olhos dos outros eu vejo os meus erros
Das tantas saudades eu guardo a paixão

Sempre que eu quero, revejo meus dias
E as coisas que eu posso, eu mudo ou arrumo
Mas deixo bem quietas as boas lembranças
VIDINHA QUE É MINHA, SÓ PRA O MEU CONSUMO...



Agradecimentos Especiais

À meus pais, **Libório** e **Nerina**, que me forjaram para a vida.

À minha irmã, **Estélvia**, com quem sempre pude contar.

Ao meu noivo, querido e amado, **Matheus**, que tanto tem me ensinado e mostrado quais são as coisas mais importantes na vida... Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos e principalmente pelo apoio, carinho e amor. Eu amo você!

Ao meu sobrinho, **Vicente**, um lindo cometa que chegou para iluminar a minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada**, pela paciência, disponibilidade e pela confiança que depositou em mim ao longo destes anos. Obrigada por tudo!

À **Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo**, pelos anos de amizade e pela disponibilidade em estar presente neste dia. É uma honra tê-la como parte da banca de avaliação de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro**, a quem devo agradecer carinhosamente, pela amizade, pelas conversas, pelo apoio, pela convivência e pela presença na banca avaliadora de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Yara Cury**, pelo carinho e atenção com que avaliou este trabalho. Fico extremamente honrada com sua presença na banca avaliadora de minha Tese de Doutorado.

Ao **Prof. Dr. Adilson Roberto Cardoso**, pela atenção e disponibilidade em participar da banca avaliadora de minha Tese de Doutorado. Obrigada por avaliar este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Fábio Rogério**, à **Profa. Dra. Nara Lins Meira Quintão** e à **Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari**, pelo carinho com que aceitaram ser suplentes da banca avaliadora de minha Tese de Doutorado.

À **Profa. Dra. Claudia Herrera Tambeli**, pela amizade e pelo exemplo de responsabilidade.

Aos Professores e funcionários membros da Comissão de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, obrigada pela agradável convivência nestes anos todos (**Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira, Andréia Aparecida Vigilato, Silvia Helena Zeferino Evangelista e Viviane Yoneko Hayakawa Gonzalez**).

À secretária do Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, **Alexandra Maria Ferraz**, pela atenção e dedicação.

À **Érika** e a **Regina**, pelo cuidado e responsabilidade no fornecimento dos ratos provenientes do CEMIB.

À minha querida amiga e “futura comadre”, **Elayne Vieira Dias**, que tantas vezes me emprestou seu ombro e me ajudou a seguir em frente.

Ao meu querido amigo, **André Schwambach Vieira** (hoje, Prof. Dr. André S. Vieira), pelo exemplo de inteligência e capacidade, pela participação direta neste trabalho e pela amizade.

Às minhas queridas amigas, **Juliana Maia Teixeira, Maria Carolina Athié e Raffaella Silvestre Ignarro**, pelo agradável convívio, pelas conversas, ajuda e principalmente pelo carinho.

Aos meus colegas do laboratório de Estudos da Dor: **Alexandre Rezende, Alyne Teixeira, César Renato Sartori, Filipe Cesar do Prado, Gustavo Facchini, Henrique Prado, Ivan José Magayewski Bonet, Janice Nascimento, Lilian Calili Camargo, Paulinha Marião e Priscila Amaral Ferreira**. Obrigada pela amizade, convivência e pelas conversas agradáveis.

Aos meus amigos de dentro e fora do Laboratório, que me acompanharam nesta estrada (**Airton Barbosa de Almeida, Caru Pereira Silveira, Daniela Dutra Rocha, Fabrício Bau Dalmas, Jozi Godoi, Luiz Fernando Ferrari, Natália Dutra Rocha, Renata de Oliveira Rocha e Patrícia Prediger**) em alguns dias ensolarados, em outros nublados, mas sempre presentes.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho e que, porventura, não foram citados, o meu **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

A liberação de Interleucina-1 β (IL-1 β) no tecido periférico estimula a síntese de Prostaglandinas (PGs), especialmente, da Prostaglandina-E₂ (PGE₂), que leva a sensibilização dos nociceptores aferentes primários induzindo a hiperalgesia inflamatória. Recentemente demonstramos que a IL-1 β pode ativar diretamente o receptor de Interleucina-1 (IL-1R) do nociceptor aferente periférico e levar a liberação de PGE₂ associada ao desenvolvimento da hiperalgesia. A IL-1 β também é liberada no Gânglio da Raiz Dorsal (GRD), entretanto a função que a IL-1 β desempenha no GRD para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória ainda não está clara. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar se a liberação de IL-1 β e a ativação do Receptor de Interleucina-1 Tipo I (IL-1RI) no GRD estão envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. A administração de IL-1Ra (antagonista natural de receptor IL-1, 6 μ g) no GRD de ratos preveniu a hiperalgesia mecânica (avaliada por meio do von Frey Eletrônico) induzida pela administração intraplantar (i.pl) de Adjuvante Completo de Freund (CFA, 100 μ L), Carragenina (Cg, 100 μ g) ou IL-1 β (0,5 pg), mas não pela administração i.pl de PGE₂ (100 ng), avaliadas 3 horas após suas administrações. Além disso, a administração i.pl periférica de CFA ou Cg aumentaram as concentrações de IL-1 β (avaliadas por ELISA) no GRD. O tratamento ganglionar (GRD-L5) com oligonucleotídeo (ODN) antisense contra IL-1RI (30 μ g/dia durante 4 dias) reduziu de maneira significativa a expressão de IL-1RI no GRD-L5 e a hiperalgesia mecânica induzida por CFA, Cg e IL-1 β , mas não pela PGE₂, administradas no tecido periférico da pata. Também verificamos a hipótese de que a prévia ativação do receptor neuronal, IL-1RI, no tecido periférico é importante para a liberação de IL-1 β no GRD e para a

subsequente hiperalgesia induzida por PGE_2 . A $\text{IL-1}\beta$ (0,5 pg/pata) co-administrada com a dose sub-limiar de PGE_2 (10 ng/pata) em patas traseiras tratadas com indometacina induziu uma proeminente hiperalgesia, que foi prevenida pelo pré-tratamento com ODN antisense contra IL-1RI ou IL-1Ra (6 μg) administrados no GRD. Além disso, o IL-1Ra reduziu a expressão de COX-2 em células do GRD. Para confirmar a ativação do IL-1RI em células do GRD, administramos Cg ou CFA no tecido periférico o que levou ao aumento da expressão de IRAK-1 e IRAK-4 em células do GRD. Os resultados deste estudo sugerem que o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória depende da ativação do receptor IL-1RI neuronal no tecido periférico que, em partes, induz a liberação de $\text{IL-1}\beta$ no GRD e subsequente ativação da COX-2. Os dados aqui apresentados oferecem novas perspectivas sobre a participação das células do GRD nos mecanismos envolvidos na hiperalgesia inflamatória e revelam novos e interessantes alvos para o controle das hiperalgesias inflamatórias.

PALAVRAS-CHAVE: Hiperalgesia, Gânglio da Raiz Dorsal (GRD), Interleucina-1 β ($\text{IL-1}\beta$), Prostaglandina- E_2 (PGE_2), Receptor de Interleucina-1 Tipo I (IL-1RI).

ABSTRACT

The release of Interleukin-1 β (IL-1 β) in the peripheral tissue stimulates the synthesis of Prostaglandins, specially, Prostaglandin-E₂ (PGE₂) that ultimately sensitize the peripheral afferent nociceptor inducing inflammatory hyperalgesia. We have recently demonstrated that IL-1 β can directly activate IL-1R receptor of peripheral afferent nociceptor to induce release of PGE₂ associated to development of hyperalgesia. IL-1 β is also released in Dorsal Root Ganglion (DRG), however the role that IL-1 β in DRG plays to development of inflammatory hyperalgesia is not yet elucidated. Therefore, the aim of this study was to investigate whether IL-1 β released in the DRG and the activation of Interleukin-1 Receptor Type I (IL-1RI) is involved in the development of the inflammatory hyperalgesia. Administration of IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist, 6 μ g) in the DRG of rats prevented the mechanical hyperalgesia (measured with Electronic von Frey) induced by intraplantar (i.pl) administration of Complete Freund's Adjuvant (CFA, 100 μ L), Carrageenan (Cg, 100 μ g) or IL-1 β (0.5 pg), but not by PGE₂ (100 ng), measured 3 hours after their administrations. Also, peripheral i.pl administration of CFA or Cg induced an increase in IL-1 β concentrations (measured by ELISA) in the DRG. Ganglionar (DRG-L5) treatment with oligonucleotides (ODN) antisense against IL-1RI (30 μ g/day for four days) reduced the expression of IL-1RI in the DRG-L5 and the mechanical hyperalgesia induced by CFA, Cg, and IL-1 β , but not by PGE₂ administered in peripheral tissue. We also verified the hypothesis that previous activation of neuronal IL-1RI in the peripheral tissue is important to the release of IL-1 β in the DRG and to the subsequent PGE₂-induced hyperalgesia. IL-1 β (0.5 pg/paw) co-administrated with a sub-threshold dose of PGE₂ (10 ng/paw), in hind paws treated with indomethacin, greatly induces hyperalgesia, which was prevented by pre-treatment with ODN

antisense against IL-1RI or IL-1Ra (6 µg) administrated in DRG. Also, IL-1Ra administrations reduced the COX-2 expression in DRG cells. To confirm IL-1RI activation in DRG cells, it was observed that IRAK-1 and IRAK-4 expression was increased in DRG neurons after administration of Cg or CFA in the peripheral tissue. These findings suggest that the development of inflammatory hyperalgesia depends on neuronal IL-RI activation in the peripheral tissue that, in turn, induces the release of IL-1 β in the DRG and subsequent COX-2 activation. These data provide new insights about the participation of DRG cells in the mechanisms underlying inflammatory hyperalgesia and reveal new interesting targets to control inflammatory hyperalgesia.

KEYWORDS: Hyperalgesia, Dorsal Root Ganglion (DRG), Interleukin-1 β (IL-1 β), Prostaglandin-E₂ (PGE₂), Interleukin-1 Receptor Type I (IL-1RI).

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

° - graus

α – alfa

β – beta

μg – micrograma

μL – microlitro

® - marca registrada

Δ – delta

A δ – fibra A delta

AA – ácido araquidônico

AC – adenilil ciclase

a.C – antes de Cristo

AINES – antiinflamatórios não esteroidais

AMPC – 3', 5' – monofosfato cíclico de adenosina

Anova – análise de variância

AS – antisense

ASP - aspartato

C – Celsius

Ca^{2+} - íons cálcio

CFA – Adjuvante Completo de Freund

Cg – carragenina

CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CL - contralateral

cm – centímetro

COX – ciclooxigenase

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAC - ácido desoxirribonucleico complementar

EP – receptor para prostaglandina do tipo E

EPM – erro padrão da média

g – grama

gl. - ganglionar

GLU - glutamato

GRD – gânglio da raiz dorsal

h – hora

IASP – International Association for Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da Dor)

i.gl. – intraganglionar

IL-1 α – interleucina 1 α

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-1RI – receptor para IL-1 do tipo I

IL-1RII – receptor para IL-1 do tipo II

IL-1Ra – antagonista específico dos receptores de IL-1

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

Indo - Indometacina

i.p. – intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

i.t. – intratecal

i.v. – intravenoso

kDa – quilodaltons

kg - quilograma

L4 – vértebra lombar 4

L5 – vértebra lombar 5

L6 – vértebra lombar 6

LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

m – metro

mL – mililitro

mg – miligrama

Mis - mismatch

mm – milímetro

NAP – neurônio aferente primário
NF- κ B – fator de transcrição nuclear kappa B
ng – nanograma
NNP – neurônio nociceptivo primário
ODN – oligodesoxinucleotídeo
pb – pares de bases
PCR – reação em cadeia da polimerase
PFA – paraformaldeído
PG – prostaglandina
PGE₂ – prostaglandina do tipo E₂
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
RPM – rotação por minuto
s – segundo
Sal - salina
SC – SC 236
SNC – sistema nervoso central
SNP – sistema nervoso periférico
SP – substância P
TNF α – fator de necrose tumoral α
V – volt
VS – valeril salicilato
WDR - neurônios de faixa dinâmica ampla

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2 As Vias de Detecção e Condução da Informação dolorosa	1
1.2.1 Estimulação das vias nociceptivas	3
1.2.2 Hiperalgesia.....	5
1.3 O gânglio da raiz dorsal (GRD).....	7
1.4 Prostaglandinas e Hiperalgesia.....	9
1.5 Interleucina-1β	14
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais.....	18
3.2 Teste nociceptivo.....	18
3.2.1 Teste do limiar nociceptivo mecânico da pata de rato.....	18
3.3 Administração de Drogas.....	21
3.3.1 Administração intraplantar (i.pl) de drogas (via subcutânea).....	21
3.3.2 Administração de drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal (administração ganglionar, gl. ou GRD-L5).....	23
3.4 Drogas.....	25
3.4.1 Oligodeoxinucleotídeo (ODN).....	26
3.5 Procedimento para retirada do gânglio da raiz dorsal.....	28
3.6 Ensaio Imuno-enzimático (ELISA).....	28
3.7 Western Blot.....	29
3.7.1 Extração de Proteínas de Gânglios das Raízes Dorsais.....	29
3.7.2 Eletroforese e ImunoBlot.....	30
3.8 Fluorescência.....	33
3.9 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Administração de Carragenina ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) no tecido periférico induz aumento da concentração de IL-1β no gânglio da raiz dorsal.....	36
4.2 Pré-tratamento com IL-1Ra (antagonista natural do receptor de IL-1β) no gânglio da raiz dorsal reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de CFA e carragenina no tecido periférico.....	38
4.3 Pré-tratamento com IL-1Ra no gânglio da raiz dorsal reduz a hiperalgesia mecânica do tecido periférico induzida pela administração de IL-1β no gânglio da raiz dorsal.....	40

4.4 Efeito do tratamento intraganglionar (L5) com antisense oligodeoxinucleotídeo (ODN-AS) contra o receptor de Interleucina-1 β (IL-1RI) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela administração periférica de CFA, Carragenina, IL-1 β ou PGE ₂	42
4.5 Importância da ativação do receptor neuronal IL-1RI do tecido periférico para a hiperalgesia inflamatória.....	46
4.6 Importância da liberação de prostaglandinas no GRD no desenvolvimento do “ <i>priming</i> ” hiperalgésico.....	47
4.7 Importância da ativação dos receptores IL-1RI do GRD para o “ <i>priming</i> ” hiperalgésico.....	49
4.8 Carragenina ou CFA administrados no tecido periférico aumentam a expressão da proteína IRAK-1 nas células neuronais do GRD-L5 e a marcação com GFAP confirma a presença desta proteína em células satélites.....	51
4.9 Carragenina administrada no tecido periférico aumenta a expressão da proteína IRAK-4 nas células neuronais do GRD-L5 e a marcação com GFAP confirma a presença desta proteína em células satélites.....	54
4.10 Inflamação do tecido periférico aumenta a expressão de COX-2 em fibras nociceptivas tipo C via liberação de IL-1 β no GRD.....	56
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

A *DOR* pode ser definida, em poucas palavras, como *a percepção de uma sensação nociceptiva*, uma vez que envolve uma série de aspectos tanto cognitivos quanto sensoriais. Embora essa definição seja mais abrangente que a inicialmente proposta pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), que define a dor como *uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual potencial ou de fato*, deve-se considerar, em uma análise restrita, que esse fenômeno envolve a **ativação das vias nociceptivas**, ou seja, as vias sensoriais responsáveis pela detecção de estímulos nociceptivos. Entretanto, seu aspecto (intensidade e duração, por exemplo) final é dependente de uma série de fatores que podem alterar a percepção do estímulo nociceptivo. O sistema nervoso central é responsável pela integração de fatores emocionais, culturais e cognitivos, que, em última instância, determinarão a percepção de dor.

1.2 As Vias de Detecção e Condução da Informação Dolorosa

Os estímulos ambientais internos ou externos ao organismo são detectados por estruturas receptoras localizadas por todo o corpo conhecidas como *receptores sensoriais*. Estes receptores traduzem a informação produzida pelos diferentes tipos de estímulo - de natureza mecânica, química ou térmica, a qual será transmitida até o sistema nervoso central (SNC) por meio das fibras nervosas aferentes (ou primárias). Estas fibras aferentes estabelecem contato com os neurônios de segunda ordem (ou secundários) que, por sua vez, conduzem a informação até os centros superiores para seu processamento (BONICA, 1990).

As fibras primárias, presentes nos tecidos periféricos e normalmente associadas aos receptores sensoriais, podem estar envolvidas por uma estrutura lipídica produzida por células chamadas *células de Schwann* denominada *bainha de mielina*, que possui a propriedade de aumentar a velocidade de condução da informação ao longo da fibra nervosa. As fibras que têm como função primária a condução de estímulos a grandes velocidades, de modo que sejam interpretados imediatamente, possuem grande quantidade desse envoltório mielínico. Fibras associadas a mecanorreceptores - especializadas na condução de estímulos de origem mecânica -, são um exemplo. Essas fibras, chamadas *A-beta* ($A\beta$), são capazes de responder a estímulos táteis, possuem largo diâmetro e conduzem o estímulo a rápidas velocidades (30 a 100 m/s).

Os estímulos indutores da sensação dolorosa (nocicepção) podem ser tanto de natureza mecânica ou térmica quanto química ou elétrica, externos ou internos ao organismo. Considerando que a sensação dolorosa é um *alarme* que indica a existência de um processo lesivo ou potencialmente lesivo ao organismo, há necessidade da presença de estruturas nervosas especializadas na sua detecção, de modo a evitar danos maiores causados por estímulos deletérios.

Fibras de diâmetros menores e com terminações livres – ou seja, não associadas a receptores sensoriais especializados - detectam esses estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Estas possuem alto limiar de ativação e são diretamente relacionadas às vias nociceptivas (AGUGGIA, 2003). Por isso, genericamente são denominadas *nociceptores*, podendo ser encontradas em dois tipos: fibras *A-delta* ($A\delta$), de médio diâmetro, finalmente mielinizadas, com velocidade de condução média, entre 12 e 30 m/s (correspondentes a 20% das fibras de dor e responsáveis pela dor rápida, aguda e lancinante que sentimos após estimulação nociva), e fibras *C* não-mielinizadas,

de pequeno diâmetro, com velocidade de condução menor (0,5 a 2 m/s) (correspondentes a 80% das fibras condutoras da informação dolorosa e responsáveis pela dor com característica lenta e difusa) (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999). Levando em conta o critério funcional, as fibras A δ respondem à estimulação mecânica, porém podem ser sensibilizadas pelo calor, enquanto as fibras do tipo C respondem tanto a estímulos térmicos quanto mecânicos e químicos, sendo classificadas, por isso, como *nociceptores polimodais*.

Tais células nervosas periféricas possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRDs) ou nos gânglios trigeminais, no caso dos neurônios sensoriais que inervam a região orofacial. Destes gânglios saem prolongamentos em direção à medula espinal (ou tronco encefálico, no caso dos neurônios orofaciais), onde estão localizados os neurônios secundários. A ativação dos neurônios sensoriais primários leva à liberação de aminoácidos excitatórios, como o glutamato (GLU), e peptídeos, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), nos terminais pré-sinápticos (MILLAN, 1999). Estas substâncias, chamadas *neurotransmissores* e *neuromoduladores*, atuarão em receptores pós-sinápticos, estimulando os neurônios secundários. A partir daí, os impulsos ascenderão para o encéfalo, onde a dor será analisada e interpretada.

Os neurotransmissores podem ser aminoácidos excitatórios (AAE) com função neurotransmissora (BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; TRACEY et al., 1991), como o glutamato (GLU) e o aspartato (ASP), ou neuropeptídeos com papel neuromodulador (JU et al., 1987; SMITH et al., 1993), como a substância P (SP), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a somatostatina (SOM), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros, liberados nos terminais das fibras neuronais (BONICA, 1990).

Uma vez liberadas, tais substâncias interagem com receptores nos neurônios de segunda ordem, ativando mecanismos bioquímicos intracelulares que terão efeito sobre a transmissão do impulso.

A partir de sua transmissão para o neurônio secundário, a informação nociceptiva ascenderá para as áreas supraespinais através de tratos neuronais específicos (espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinocervicotalâmico, espinoparabraquial, espinoparabraquio(trigêmio)hipotalâmico, via pós-sináptica da coluna dorsal (MILLAN, 1999; BESSON; CHAOUCH, 1987; PRADO, 1999), até a convergência em populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo (núcleo ventrobasal) (MILNE et al., 1981). Nesse nível, a informação será conduzida para as áreas sensoriais do córtex cerebral e suas várias características serão integradas, ou seja, aspectos como qualidade, intensidade, localização, duração e os componentes afetivo e emocional serão interpretados, diferenciando a sensação dolorosa da percepção (NOBACK et al., 1996).

1.2.1 Estimulação das vias nociceptivas

A terminologia *nociva* se refere a algo que causa dano, provoca prejuízos. Um estímulo nocivo causa dano a um determinado tecido, ou seja, é injuriante, prejudicial. Por outro lado, o termo *nociceptivo* se refere a algo que ativa as vias sensoriais especializadas em conduzir a informação produzida pelos estímulos nocivos ou potencialmente nocivos. Desta forma, um estímulo nociceptivo pode ser caracterizado como um estímulo capaz de ativar essas vias. Porém, nem sempre as vias nociceptivas são ativadas somente por estímulos nocivos. Em certas situações as vias de condução nociceptivas podem ser ativadas por estímulos não-nocivos. Isso não significa que o

estímulo não é capaz de causar prejuízo tecidual, mas sua intensidade é suficiente para levar à ativação das vias nociceptivas. Em resumo, pode-se dizer que o estímulo nocivo é relacionado à qualidade da estimulação em si, que pode danificar o tecido, enquanto o estímulo nociceptivo é relacionado às fibras nervosas nociceptivas, que podem ser ativadas por qualquer tipo de estímulo, contanto que em quantidade suficiente para ativá-las. A nocicepção, desta forma, não é relacionada à qualidade do estímulo em si, mas, sim, aos aspectos quantitativos da estimulação.

Em uma analogia simplista, pode-se dizer que a dor é uma espécie de *alarme* fisiológico, que alerta o organismo que algo está errado ou que existe uma ameaça à sua integridade. Assim, a dor imediata é justamente a ativação das vias sensoriais responsáveis por detectar a presença de estímulos que são prejudiciais (nocivos) ou potencialmente prejudiciais. Envolve fenômenos iônicos, ou seja, existe a indução de uma resposta elétrica nestas fibras sensoriais responsáveis pela detecção de estímulos de alta intensidade, com entrada do íon sódio (Na^+) por canais específicos, que conduzirá a informação ao longo das vias nociceptivas, desencadeando, finalmente, a reação (ou a percepção). Contudo, é necessário dizer que alterações metabólicas nestas células neuronais também podem induzir mudanças na maneira como essas fibras detectam e conduzem a informação dolorosa. Dependendo do tipo de alteração, tipos diferentes de fenômenos podem ser observados.

1.2.2 Hiperalgisia

Em determinadas condições, a dor é acompanhada por fenômenos paralelos, como a chamada hiperalgisia. Este fenômeno é resultado da sensibilização das fibras neuronais sensoriais responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos – aqueles

capazes de ativar o sistema nociceptivo. Segundo inúmeros estudos, essa sensibilização, caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal (RIEDEL; NEECK, 2001), ocorre por ação de mediadores produzidos pelo processo inflamatório (HUANG et al., 2006; VERRI et al., 2006). Estes mediadores atuarão em seus respectivos receptores, induzindo, como resultado final, alterações metabólicas que facilitarão a produção de potenciais de ação pelos neurônios nociceptores. Em outras palavras, essas fibras poderão ser ativadas mais facilmente frente à estimulação, e, devido a essa nova condição, estímulos que antes não eram capazes de ativá-las, passam a sê-lo, ou a fazê-lo mais intensamente. Assim, o processo inflamatório pode ser, de modo geral, diretamente associado à hiperalgesia (dor aumentada em resposta a um estímulo que já era doloroso). Mais ainda, diversos trabalhos têm mostrado que a atuação desses mediadores inflamatórios leva ao desenvolvimento de alterações fenotípicas nos neurônios sensoriais que contribuem para esse estado sensibilizado. Como exemplo podemos citar o aumento na expressão de alguns tipos de canais de sódio (Na^+) preferencialmente em fibras nociceptoras, considerado um dos principais focos da pesquisa dos mecanismos fisiopatológicos da dor (ENGLAND et al., 1996; GOLD et al., 1998; KHASAR et al., 1998; PORRECA et al., 1999; WOOD, 2004).

Outro fenômeno observado em alguns quadros de origem inflamatória é a chamada *alodinia*. De modo semelhante à hiperalgesia, a alodinia refere-se à sensação dolorosa induzida por um estímulo que, em condições normais, seria insuficiente para provocar esta sensação. A idéia que prevalece atualmente é que a hiperalgesia / alodinia resulta da sensibilização dos neurônios sensoriais primários associada à ativação de nociceptores polimodais de alto limiar e *nociceptores dormentes*, os quais

somente respondem a estímulos quando sensibilizados (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990a; MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990b). Esta classe de nociceptores, descrita em 1988 por Schaible e Schmidt (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988), não responde a estímulos mecânicos ou térmicos imediatos, mas é recrutada durante o processo inflamatório. Embora tenham sido inicialmente observados em estudos eletrofisiológicos com registros feitos em nervos de articulações de joelhos, também foram verificados em tecidos cutâneo e visceral (WILLIS; WESTLUND, 1997), sendo diretamente relacionados aos quadros hiperalgésicos. Nesse sentido, apesar da importância da inflamação para esse fenômeno, é relevante lembrar que, em determinadas condições, a hiperalgesia / alodinia não pode ser considerada apenas consequência da ação de mediadores inflamatórios. Durante as dores de origem neuropática (onde a dor decorre de injúria ou alterações nos nervos sensoriais), por exemplo, algumas fibras normalmente capazes de responder apenas a estímulos táteis passam a responder como nociceptores, de modo que, então, estímulos inócuos passam a ser percebidos como nocivos (BONICA, 1990; KOERBER et al., 1994; KOHAMA et al., 2000). Porém, embora exista a sugestão de que essas dores são intimamente relacionadas a quadros inflamatórios (MA; EISENACH, 2002; ZHAO et al., 2000), essa discussão deverá ser retomada em outra oportunidade, já que escapa do enfoque deste trabalho.

1.3 O gânglio da raiz dorsal (GRD)

Os nervos periféricos aferentes são constituídos pelos axônios de células neuronais cujos corpos celulares estão localizados em uma estrutura situada no local de penetração da fibra nervosa na barreira meníngea. Tal estrutura é chamada de *gânglio da raiz dorsal* (GRD).

No interior de um GRD típico há milhares de neurônios sensoriais, com grande heterogeneidade no que diz respeito à espessura das fibras, ao tamanho dos corpos celulares e quantidade de mielina envolvendo essas fibras (KOERBER; MENDELL, 1992). O GRD está envolvido por uma cápsula que consiste de uma camada de tecido colágeno margeada internamente por lâminas de células perineurais (WAGGENER; BEGGS, 1967). Embora alguns estudos tenham descrito histologicamente a cápsula que envolve os GRDs, alguns autores divergem quanto à efetividade de substâncias inoculadas no espaço subaracnóide penetrarem essa bainha, atingindo diretamente os corpos celulares neuronais (SEITZ et al., 1981). Porém, uma diversidade de estudos farmacológicos utiliza técnicas de administração de substâncias *via intratecal*, ou seja, a administração de drogas diretamente no espaço subaracnóide, para induzir ou inibir a expressão de moléculas nos GRDs (LAI et al., 2002; PARADA et al., 2003). Segundo Ji et al. (2002) essa via intratecal de inoculação de drogas pode ser utilizada para permitir acesso de substâncias aos neurônios do GRD, uma vez que a membrana dura mater se estende sobre a cápsula do gânglio de maneira que seu pólo proximal está em direta continuidade com o espaço subaracnóide (MICHAEL et al., 1997; PORRECA et al., 1999), ou seja, banhado pelo fluido cérebro-espinhal. A comunicação entre este fluido e as células no interior do GRD é levada em consideração em muitos experimentos nos quais se procura alterar padrões de expressão de moléculas em neurônios do GRD (LAI et al., 2002; MICHAEL et al., 1997).

Outro dado importante com relação ao GRD foi a demonstração, por meio de técnicas de imunocitoquímica e registros eletrofisiológicos, da presença de receptores para mediadores inflamatórios no soma celular, dentro dos GRDs. Shinder e Devor (1994) descreveram um grande número de diferentes moléculas quimiorreceptoras na

membrana dos corpos celulares presentes no GRD e levantaram a hipótese de que esta estrutura não teria apenas papel na manutenção metabólica dos neurônios, mas, também, função na transmissão do impulso neuronal (para revisão ver DEVOR, 1999).

Em resumo, os neurônios do GRD são células grandes, cilíndricas, com diâmetro variável entre 20-150 μm , classificados como “pseudounipolares”, ou seja, a partir de seu corpo celular, há um prolongamento que, após dezenas ou centenas de microns, se divide em dois, formando um “T” ou “Y”. Um ramo se dirige para os tecidos periféricos enquanto outro ramo entra na medula espinal, se conectando com os neurônios de segunda ordem. O conjunto de neurônios com corpo celular localizado no GRD forma o nervo periférico junto com as fibras motoras. A injúria tecidual periférica estimula as terminações do neurônio aferente primário produzindo impulsos que percorrerão o axônio desde a periferia até o sistema nervoso central, passando pela junção em “T” e, embora não haja a necessidade de que o impulso invada o corpo celular no GRD para que ocorra comunicação sensorial entre a periferia e a medula, na maioria destes neurônios o impulso conduzido ao longo do axônio invade o soma celular, sugerindo um papel relevante desta estrutura na propagação do estímulo aferente (DEVOR; OBERMEYER, 1984).

1.4 Prostaglandinas e Hiperalgisia

Vários trabalhos demonstram que as prostaglandinas (PGs), principalmente as da série E, são mediadores que causam hiperalgisia inflamatória (FERREIRA, 1973). As PGs são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico (AA) e sua ativação ocorre por estímulos mecânicos, químicos ou infecciosos (FERREIRA; VANE, 1967).

A inibição da COX e conseqüentemente, da síntese de prostaglandinas foi o mecanismo originalmente descrito por Vane (1971), Ferreira (1972) e Ferreira et al. (1973) para explicar as propriedades analgésicas dos antiinflamatórios não-esteroidais. Portanto, dentre os mediadores inflamatórios, as prostaglandinas merecem papel de destaque. São pertencentes a uma família de substâncias, os eicosanóides que inclui, além das PGs, os leucotrienos (LT) e compostos relacionados, derivados de ácidos graxos essenciais compostos de 20 carbonos que contém 3, 4 ou 5 duplas ligações. Os exemplos mais comuns são o ácido 8,11,14-eicosatrienóico (ácido di-homo- γ -linolênico), o ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico (ácido araquidônico) e o ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico. No homem, o ácido araquidônico é o mais abundante, sendo ingerido como constituinte da carne, ou sendo produzido como resultado do metabolismo do ácido linoléico proveniente da dieta alimentar de origem vegetal. É então esterificado (araquidonato) como um componente de fosfolipídios de membranas celulares ou com outros lipídios complexos (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996; NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999).

Os eicosanóides obtidos a partir destes ácidos graxos são distribuídos em várias classes principais, designados por letras (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J) e distinguidas por substituições no anel de ciclopentano. As classes principais são ainda subdivididas segundo o número de duplas ligações nas cadeias laterais. Isto é indicado por 1, 2 e 3 subscrito e expressa o ácido graxo precursor. Assim os eicosanóides derivados do ácido di-homo- γ -linolênico são designados pelo número 1 subscrito (1), os derivados do ácido araquidônico pelo número 2 (2) e os derivados do ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico pelo número 3 (3). Substâncias endógenas, tais como hormônios e autacóides, aumentam a biossíntese de eicosanóides por meio da ativação de

fosfolipases (A2 e/ou C) ou, ainda, aumentam a concentração de cálcio intracelular. A fosfolipase A2 ativada hidrolisa o fosfolípido de membrana liberando o ácido araquidônico. Por outro lado, a fosfolipase C quebra o fosfolípido resultando na formação do 1,2-diglicerídeo, que sofre reações posteriores até a liberação do ácido araquidônico. Uma vez liberado, uma parte do ácido araquidônico é rapidamente metabolizada em produtos oxigenados por vários sistemas enzimáticos distintos, cujas enzimas principais são as ciclooxygenases (COX) e as lipoxigenases.

Os prostanóides da série 2, resultantes da ação enzimática da COX sobre o ácido araquidônico, compreendem as prostaglandinas (PG2) e os tromboxanos (TX2). A COX, também conhecida como prostaglandina H sintase ou prostaglandina endoperóxido sintase, cicliza e oxigena enzimaticamente o ácido araquidônico, gerando um endoperóxido instável chamado prostaglandina G2 (PGG2), posteriormente hidrolisado à prostaglandina H2 (PGH2), e que, dependendo da célula, será convertido em PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂ por isomerases e sintases específicas (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996; NARUMIYA; FITZGERALD, 2001; SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). Os prostanóides então formados são, em sua maior parte, imediatamente liberados para fora da célula sendo responsáveis por uma grande variedade de funções biológicas, inclusive hiperalgesia e inflamação no homem (FERREIRA, 1972). Foi demonstrado que principalmente a prostaglandina do tipo E (PGE₂) induz a hipernocicepção (FERREIRA; VANE, 1967) e desenvolvimento de sensibilização nociceptiva na pata de rato relacionada à inflamação (KUHN; WILLIS, 1973).

Inicialmente foi descrita a existência de pelo menos duas isoformas da COX, as chamadas COX-1 e COX-2, sendo a COX-1 expressa constitutivamente em muitos

tecidos, incluindo os rins, estômago, músculo liso vascular e plaquetas, e a COX-2, indetectável em muitos tecidos, podendo ser induzida por mediadores inflamatórios, tal como citocinas ou fatores de crescimento (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996; TRIFAN; HLA, 2003).

Uma terceira isoforma, a COX-3, foi mais recentemente descoberta como sendo derivada do mesmo gene que origina a COX-1, isto é, a COX-3 é uma variação genética da COX-1 e por isto também é chamada COX-1-V1. Sua expressão foi detectada no Sistema Nervoso Central e na aorta de humanos e cães e, nos rins, no coração, na cartilagem e em tecidos neuronais de roedores (GOSSET et al., 2006). Também é creditada à COX-3 a atividade analgésica do paracetamol, embora tal mecanismo ainda não esteja completamente elucidado (KIS; SNIPES; BUSIJA, 2005).

A inibição da COX, sobretudo a COX-1, embora seja eficaz no tratamento da dor inflamatória, induz uma série de efeitos colaterais, implicados no bloqueio das suas funções fisiológicas nas quais esta isoforma expressa constitutivamente está envolvida. Desta maneira, após a descoberta da segunda isoenzima da COX (COX-2 - inicialmente chamada de isoforma induzida por ser expressa durante processo inflamatório), levou a uma corrida pela descoberta de drogas que fossem seletivas para esta isoforma e que, por conseguinte, teriam apenas os efeitos benéficos da inibição da síntese de PGs. Desde então, inúmeros trabalhos têm ressaltado a importância da COX-2 em diferentes modelos de inflamação e dor inflamatória (ZHANG et al., 1997; HAY; DE BELLEROCHE, 1997; YAMAMOTO; NOZAKITAGUCHI, 1996, 2002; NANTEL et al., 1999; SAMAD et al., 2001; FRANCISCHI et al., 2002; GHILARDI et al., 2004).

As lipoxigenases, por sua vez, pertencem a uma família de enzimas que catalizam a oxigenação de ácidos graxos poliênicos em hidroperóxidos. Os metabólitos

do ácido araquidônico são chamados ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETE). A 5-lipoxigenase é talvez a mais importante dessas enzimas, pois conduz à síntese dos leucotrienos, inclusive o LTB₄ que, durante o processo inflamatório, pode estar também envolvido no desenvolvimento de hiperalgesia (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996). A metabolização do ácido araquidônico inclui vias não enzimáticas de conversão em produtos com estruturas similares às das prostaglandinas, tais como os isoprostanos, que, diferente dos derivados da COX, são peroxidados *in situ* nos fosfolipídios de membranas por espécies ativas de oxigênio e, subsequente, liberados pré-formados. Conseqüentemente, sua produção não é afetada por bloqueadores do metabolismo do ácido araquidônico livre, como, por exemplo, os antiinflamatórios não-esteroidais (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996). Dentre os isoprostanos, a 8-iso-PGE₂, que pode ser produzida durante a lesão tecidual associada ao estresse oxidativo, tem demonstrado atividades hipernociceptivas por sensibilizarem os neurônios nociceptivos (EVANS et al., 2000). Outro metabólito do ácido araquidônico é a anandamida, uma substância resultante da associação com a etanolamida no cérebro e ligante endógeno para receptores canabinóides, cuja ativação produz analgesia, dentre vários efeitos biológicos (CAMPBELL; HALUSHKA, 1996).

No Sistema Nervoso Central, tanto o RNA mensageiro (RNAm) para COX-1 e COX-2 quanto as proteínas são constitutivamente expressos. Em cultura de células do gânglio da raiz dorsal (GRD) o RNAm para a COX-1 e COX-2 foi detectado, entretanto somente a proteína para COX-1 e não a COX-2 é constitutivamente expressa neste tecido. A COX-1 é expressa em neurônios de pequeno e médio calibre, no citoplasma e principalmente na membrana nuclear, assim como no axônio, sugerindo que as prostaglandinas podem ser sintetizadas e liberadas pelos terminais centrais e

periféricos dos neurônios aferentes primários (revisado por VANEGAS; SCHAIBLE, 2001). Além disso, em cultura de células do GRD estimuladas com IL-1 β , os níveis de RNAm para COX-1 não se alteram, enquanto os níveis de RNAm para a COX-2 aumentam substancialmente (INOUE et al., 1999).

Dentre os estímulos inflamatórios capazes de induzir a síntese e liberação de PGs está a citocina denominada interleucina-1 β (IL-1 β), além evidentemente dos próprios agentes inflamatórios que induzem sua liberação endogenamente como a carragenina e o lipopolissacarídeo de *E. coli* (revisado por POOLE et al., 1999).

1.5 Interleucina 1 β

A IL-1 β é um polipeptídeo produzido por uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, sinoviócitos, mastócitos, células da glia e neurônios (veja em BIANCHI et al., 1998). São encontrados três ligantes membros da família da IL-1, cujo peso molecular é de 17.5 kDa. A IL-1 possui duas isoformas ativas, IL-1 β e IL-1 α os quais são agonistas de receptores específicos associados à membrana plasmática, bem como de receptores solúveis, e o IL-1Ra, um antagonista natural dos receptores de IL-1. Existem dois tipos principais de sítios de ligação para a IL-1 (IL-1RI e IL-1RII) derivados de diferentes genes localizados no cromossomo 2 e uma proteína acessória do receptor (IL-1RaP; SIMS et al., 1995). O receptor do tipo I (IL-1RI) ativa uma cascata de sinais intracelulares, enquanto o receptor do tipo II, apesar da ligação com a molécula de IL-1, não ativa sinais intracelulares, funcionando apenas como sítio de ligação para a IL-1 (DINARELLO, 1996).

A interleucina-1 exerce a maioria de suas ações biológicas por meio da indução da transcrição de diferentes genes que irão codificar quimiocinas, citocinas, proteínas de fase aguda, moléculas de adesão celular e enzimas envolvidas na produção de mediadores pró-inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a COX-2 e a fosfolipase A2 (PLA2) (WESCHE et al., 1997; DINARELLO, 1996). A ligação da IL-1 ao IL-1RI resulta na formação da IL-1RAcP e consequentemente na ativação de uma proteína adaptadora, o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que então se liga à quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK) e consequentemente à ativação das duas principais vias de sinalização da IL-1, a do fator de transcrição nuclear NF- κ B e a cascata das proteinoquinas ativadas por mitógenos (MAPK) (ROTHWELL; LUHESHI, 2000). Até o momento foram identificados 4 membros da família de quinases: duas ativas, a IRAK-1 e IRAK-4 e duas inativas, a IRAK-2 e IRAK-M, sendo que, a expressão de IRAK-1 e IRAK-4 sinaliza a ativação do receptor de IL-1 β (CAO et al., 1996).

A primeira indicação do efeito hiperalgésico da IL-1 β foi no tecido periférico durante um processo inflamatório (FERREIRA et al., 1988). Desde então, seu envolvimento na hiperalgesia inflamatória tem sido descrito por diferentes autores tanto no tecido periférico (SCHWEIZER et al., 1988; OKA et al., 1993; REEVE et al., 2000, FALCHI et al., 2001; SUNG et al., 2005), quanto no Sistema Nervoso Central (SAMAD et al., 2001), embora neste caso o papel da IL-1 β não esteja ainda bem esclarecido. Enquanto alguns autores descrevem ação hiperalgésica da IL-1 β no Sistema Nervoso Central (OKA et al., 1993; REEVE et al., 2000; FALCHI et al., 2001; SUNG et al., 2004, 2005), outros a descrevem como uma citocina que induz analgesia (NAKAMURA et al., 1988; BIANCHI et al., 1991; SOUTER et al., 2000; JI et al., 2002). De qualquer modo, todos os membros da família da IL-1 (IL-1 β , IL-1 α , IL-1Ra) e seus receptores (IL-1RI, IL-

RIL, IL-1AcP) são expressos em células do Sistema Nervoso Central (microglias, astrócitos, oligodendroglia, neurônios, células endoteliais e células imunes circulantes – VITKOVIC et al., 2000; TOUZANI et al., 1999; DAVIES et al., 1999; PEARSON et al., 1999; BLASI et al., 1999). Além disso, foi demonstrado que os neurônios sensoriais primários são capazes de liberar IL-1 β (COPRAY et al., 2001).

Recentemente foi demonstrado que a administração intratecal (i.t.) de IL-1 β induz hiperalgesia mecânica bilateral em patas de ratos, a qual é mediada por PGs (BRAZ, 2003). De fato, a administração intratecal de IL-1 β aumenta a expressão de RNA mensageiro para a COX-2 na medula espinal e os níveis de PGE₂ no líquido cefalorraquidiano (SAMAD et al., 2001).

Embora não restem dúvidas quanto à eficiência da inibição da COX no controle das hiperalgesias inflamatórias, não se conhece até então o papel das COX-1 e COX-2 do Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Dados do nosso grupo de pesquisa (ARALDI et al., 2012) demonstraram que a ativação das COX-1 e COX-2 no GRD é importante para o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pelo agente inflamatório carragenina ou pela citocina IL-1 β administrados no tecido periférico, mas não pela PGE₂.

O objetivo geral deste trabalho é estudar a importância da liberação de IL-1 β , pelas células do GRD, para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico. Este estudo também propõe verificar se este mecanismo depende da isoforma 2 da COX presente no GRD.

2. OBJETIVOS

- ✓ Investigar a importância da IL-1 β produzida pelas células do GRD para o estabelecimento da hiperalgesia inflamatória;
- ✓ Verificar a relação entre a liberação endógena de IL-1 β , pelas células do GRD, e a isoforma da COX (COX-2) no desenvolvimento das hiperalgesias inflamatórias;
- ✓ Verificar a importância da ativação do receptor IL-1RI neuronal pela IL-1 β no tecido periférico na produção de IL-1 β , no GRD, e na hiperalgesia inflamatória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (180-220 g) provenientes do CEMIB da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Os ratos permaneceram cerca de um mês no biotério do Departamento de Biologia Funcional e Estrutural, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à comida e água, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEUA/UNICAMP, nº 1462-1.

3.2 Teste nociceptivo

O teste nociceptivo foi realizado entre 08:00 e 16:00 h. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais conscientes, recomendadas pela IASP (International Association for the Study of Pain) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Científica com Animais, da Unicamp.

3.2.1 Teste do limiar nociceptivo mecânico da pata de rato: O uso de filamentos de von Frey (VON FREY, 1896) é um método utilizado rotineiramente em procedimentos experimentais para avaliar nocicepção. Esse método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado inicialmente em humanos (JENSEN et al., 1986) e posteriormente em ratos (MÖLLER et al., 1998). Neste trabalho, os experimentos foram realizados com um anesthesiômetro eletrônico (MODELO 1601C, *LIFE SCIENCE INSTRUMENTS*, Califórnia, EUA), que consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g e

este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de força com a pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para habituação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais (**Figura 1**). O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada (**Figura 2**). Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até que o animal apresentasse 3 medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata. A intensidade de hiperalgesia foi quantificada como a variação na força (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (gramaforça), observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (gramaforça) após a administração dos estímulos, os quais variaram de acordo com os protocolos experimentais (**Figura 3**).

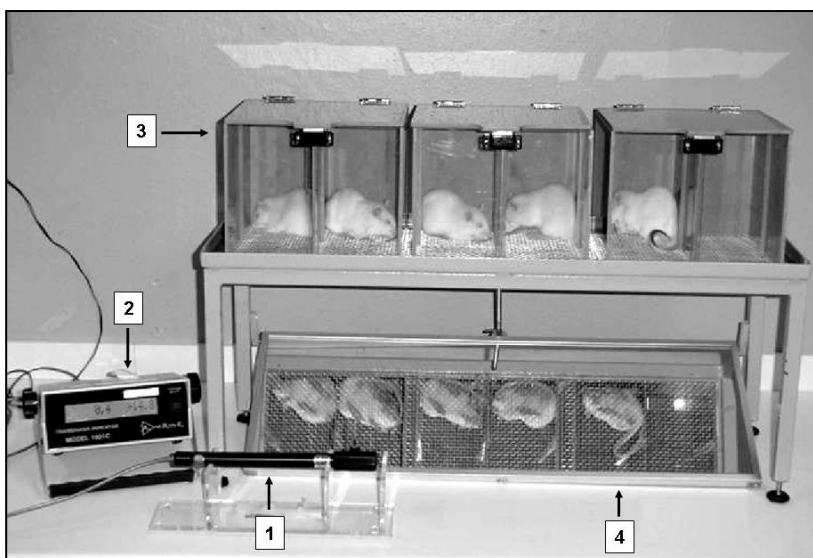


Figura 1: Equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata. A foto apresenta o anestesiômetro eletrônico (Modelo 1601C, *LIFE SCIENCE INSTRUMENTS*, Califórnia, EUA), constituído por transdutor de pressão (1) conectado a um contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 20 x 17 cm de altura) (3) e os espelhos inclinados (4) abaixo do assoalho, para fornecer uma visão desobstruída das patas traseiras dos animais utilizados no teste de pressão crescente na pata de ratos.

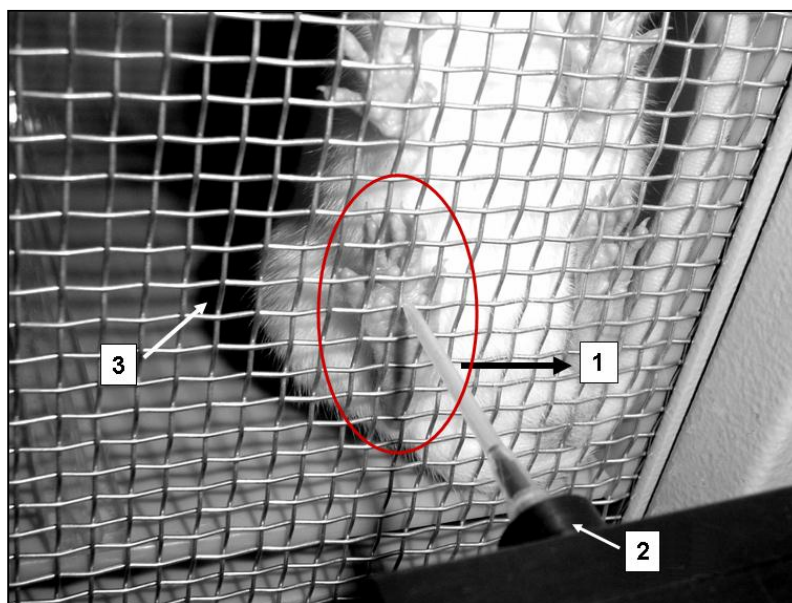


Figura 2: Momento do teste de pressão crescente na pata. A foto apresenta a ponta de polipropileno (1), acoplada ao transdutor de força (2), em contato com a pata do animal (círculo vermelho). O experimentador deve aplicar, por entre as malhas da rede do assoalho (3), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata, até que o animal produza a resposta de sacudida caracterizada como “*flinch*”.

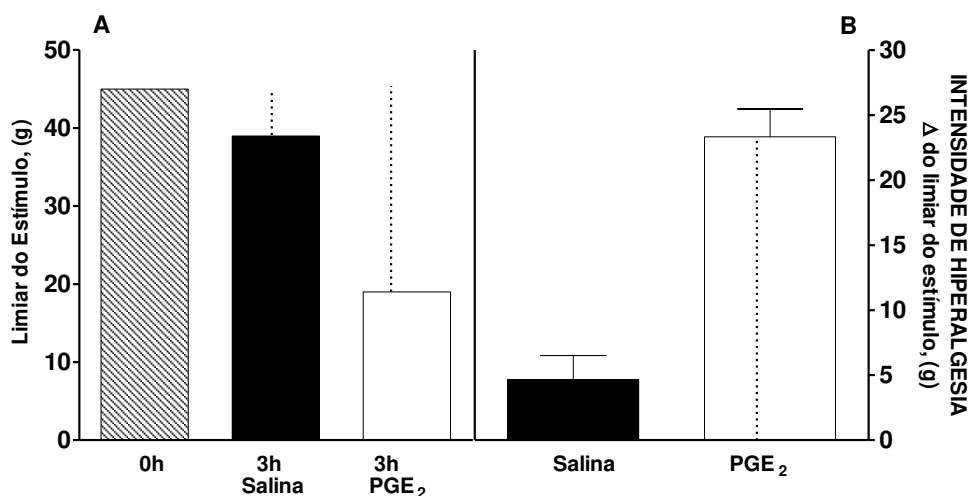


Figura 3: Parâmetros utilizados para o cálculo da intensidade de hiperalgesia. Painel A: Limiar de estímulo em gramas avaliado na zero hora (0h) e 3 horas após a administração de salina (3h; Salina) ou prostaglandina-E₂ (3h; PGE₂). **Painel B:** Intensidade de hiperalgesia, em gramas, que corresponde à diferença entre os limiares de estímulo em gramas, medidos na zero hora e na 3^a hora após a administração de salina ou prostaglandina-E₂ (indicado pelas linhas pontilhadas).

3.3 Administração de Drogas

3.3.1 Administração intraplantar (i.pl) de drogas (via subcutânea)

As drogas foram injetadas na pata traseira dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa e inserida no meio da pata, entre as cinco calosidades distais, no mesmo local de aplicação do estímulo mecânico. Volumes de 100 µl (quando apenas uma droga foi injetada) ou 50 µl (quando mais de uma droga foi injetada no mesmo sítio) foram administrados (PARADA et al., 2003).

O campo periférico responsivo às administrações de drogas no GRD-L5 foi mapeado neste estudo. Demonstramos que a administração de lidocaína 2% (3 µL) no GRD-L5 eleva significativamente o limiar nociceptivo no campo periférico onde administramos nossos estímulos inflamatórios (**Figura 4A**). Também para demonstrar

que múltiplas administrações no GRD-L5 não alteram o limiar de resposta nociceptiva mecânica, durante 4 dias, o mesmo foi medido antes e depois da administração intraganglionar de lidocaína 2%. A lidocaína aumentou significativamente o limiar nociceptivo mecânico, avaliado pelo von Frey eletrônico, 15 e 30 min após sua administração. A região cujo limiar foi alterado está demonstrada na **Figura 4B**. Para confirmar que as administrações múltiplas não afetam o limiar de resposta dos neurônios, após 24 horas da administração de lidocaína os ratos não apresentaram nenhuma mudança no limiar basal de retirada da pata.

Administramos DAPI (marcador fluorescente para núcleos) no tecido periférico (campo responsivo ao GRD-L5) e depois de 24 horas, avaliamos através de fluorescência a presença deste marcador nas células do gânglio da raiz dorsal L5. Observamos que o DAPI administrado no tecido subcutâneo da pata traseira direita do rato foi capaz de marcar o núcleo tanto das células neuronais, assim como das células satélites presentes no GRD-L5 (**Figura 4C**).

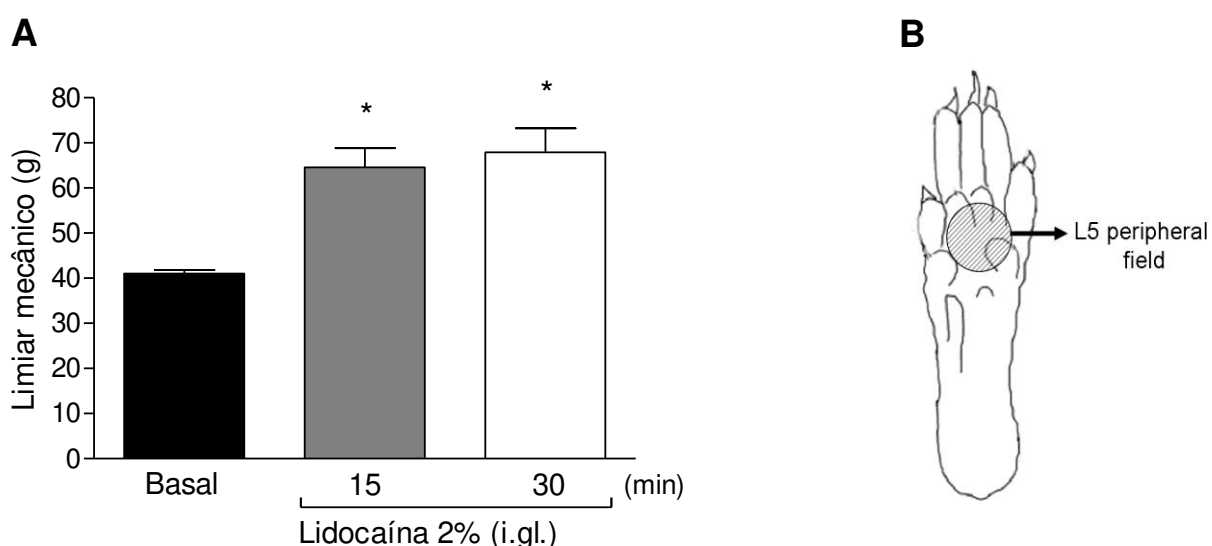


Figura 4. Efeito da administração de Lidocaína no GRD-L5 sobre o limiar nociceptivo mecânico de retirada de pata de ratos. (A) Lidocaína 2% (3 μ L) foi administrada no GRD-L5

(i.gl.) durante 4 dias consecutivos (1 vez ao dia). Quinze e 30 minutos após a administração da lidocaína 2% o limiar de retirada da pata direita dos animais, foi avaliado através do von Frey eletrônico. **(B)** O efeito da lidocaína administrada no GRD-L5 foi mapeado na pata traseira do rato para determinar o campo responsivo à injeção no GRD-L5 (*L5 peripheral field*). As barras representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * indica diferença estatística ($p < 0,05$, one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni) entre o grupo Basal e os grupos tratados com Lidocaína (i.gl., 15 e 30 min).

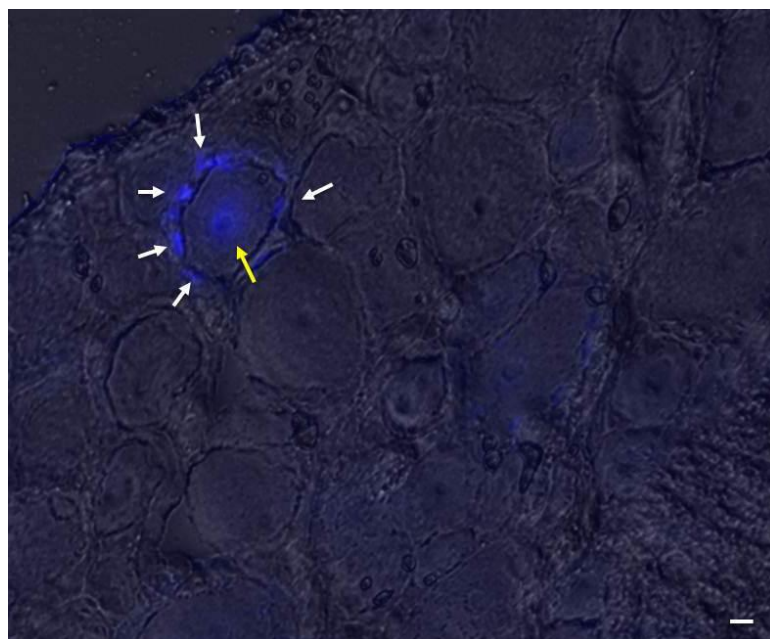


Figura 4C. Administração de DAPI no tecido periférico marca células neuronais e satélites no GRD-L5. DAPI foi administrado no tecido periférico da pata direita traseira de ratos e após 24 horas o GRD-L5 foi coletado e a fluorescência foi feita em cortes deste GRD demonstrando a marcação dos núcleos celulares pelo DAPI. As setas brancas demonstram a marcação dos núcleos das células satélites e a seta amarela demonstra a marcação do núcleo de uma célula neuronal (escala de 50 μ m e aumento de 40x).

3.3.2 Administração de drogas diretamente no gânglio da raiz dorsal

(administração ganglionar (gl.), intraganglionar (i.gl.) ou GRD-L5)

Para a inoculação de drogas no gânglio da raiz dorsal (GRD), foi utilizado o método de injeção direta no GRD (FERRARI et al., 2007), o que nos permite a verificação dos efeitos das drogas apenas sobre neurônios nociceptivos primários e células satélites sem a possibilidade de ação das mesmas em neurônios medulares

(secundários) ou em outras células do tecido periférico. Como previamente descrito (FERRARI et al., 2007) o GRD-L5 possui a maioria dos corpos celulares dos neurônios nociceptivos primários que inervam a porção central da pata de ratos, onde foram administrados os agentes inflamatórios, as drogas perifericamente e onde foi medido o limiar nociceptivo mecânico. Devido à sua dimensão diminuta, volumes acima de 5 μ L são passíveis de extravasar e permear estruturas adjacentes ao gânglio. Assim, para que volumes pequenos pudessem ser administrados, foi confeccionada uma escala utilizada para controle fino da quantidade de solução injetada. Esta escala foi adaptada a um cateter de 30 cm PE-10 (Intramedic Clay Adams, diâmetro interno de 0.28 mm e externo de 0.61 mm), calibrado de maneira que 25 mm de deslocamento da solução dentro do cateter corresponderiam ao depósito de 1 μ l de solução. O cateter foi conectado a uma agulha gengival (Injecta, 30G, curta), e, em sua outra extremidade, por meio de uma válvula tri-way, a uma seringa de vidro. Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais foram anestesiados por via inalatória por halotano e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo que sua região lombar fique hiperfletida. A 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas, foi inserida uma cânula-guia (25x10, 19G) com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. Esta última foi inserida, através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral seja atingido. Com movimentos finos a agulha atinge o GRD e neste momento ocorre um reflexo característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no gânglio da raiz dorsal do quinto nervo espinal

lombar, o qual está localizado sob o processo transversal da quinta vértebra lombar. Em seguida, o êmbolo da seringa de vidro foi deslocado 12,5 cm totalizando um volume de 5 µl injetado. Após a injeção da droga, os animais foram recolocados na caixa para se recuperarem da anestesia. O procedimento total de administração intraganglionar (i.gl.) durou de 10 a 15 min até a recuperação do estado consciente dos ratos.

3.4 Drogas

Carragenina → (FMC corporation);

CFA (Complete Freund's Adjuvant) → Adjuvante Completo de Freund (*Sigma Chemical, Co., St. Louis, EUA*)

Lidocaína → Cloridrato de Lidocaína 2%, anestésico local (*Cristalia, São Paulo, Brasil*).

IL-1Ra → Recombinante humana, antagonista de receptores do tipo I (IL-1RI) - doada gentilmente por Stephen Poole (*NIBSC - National Institute for Biological Standards and Control, Herts, UK*);

Indometacina → (1-[P-chlorobenzoyl]-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid) (*Sigma Chemical, USA*) - Inibidor não-seletivo da COX - dissolvida em tampão TRIS e re-suspensa em solução de cloreto de sódio 0,9% (*Equiplax, Brasil*);

Interleucina-1β → Recombinante humana (*NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control, Herts, UK*). A atividade específica deste material é de 100,000 IU microg⁻¹ ampola⁻¹;

Prostaglandina E₂ → (*Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA*).

3.4.1 Oligodeoxinucleotídeo (ODN)

O ODN utilizado neste estudo foi obtido da Bionner (USA). O ODN antisense (ODN-AS) específico para IL-1RI foi desenhado a partir do genoma de rato disponível pela GeneBank (Pubmed – Medline). O desenho do ODN foi feito por um programa (<http://www.dharmacon.com>) cujo algoritmo continha 8 critérios para a melhor sequência possível segundo estabelecido por Stone; Vulchanova, (2003) para uma sequência de 15-20 pares de bases:

1. 30% a 52% da sequência de bases CG
2. No mínimo 3 “A” ou “T” nas posições de 15 a 19
3. Ausência de repetições internas
4. “A” na posição 3
5. “A” na posição 19
6. “T” na posição 10
7. Ausência de C ou G na posição 19
8. Ausência de G na posição 13

ODN antisense específico para IL-1RI

```
> NM_013123.3    GI:148747432|  Rattus norvegicus interleukin 1  
receptor, type I (Il1rl1), mRNA
```

TARGET: TGGAGAATATGAAAGTG

COMPLEMENTAR: GTGAAAGTATAAGAGGT

REVERSO: 5' - CACTTTCATATTCTCCA - 3'

```
ATGCTGCCGAGGCTTGTGACATCTTCGGCTAAATCCTCCATCCTGGAGAATATGAAAGTGCTACT  
TGGGTTTCATTTGTCTCATTGTGCCTCTGCTGTCGCTGGAGACCGACAAATGCACGGAGTATCCAA
```

ATGAGGTCATTTTCATTTTCATCCGTAAATGAAATTGACATTCGCAGCTGTCCTCTTACTCCAAAC
GAAATGCATGGCGGCACCATAATCTGGTATAAAAAATGACAGCAAGACCCCATATCAGCGGACAA
GGACTCCAGGATTCATCAGCAGAATGAACATCTTTGGTTTGTTCCTCGCCAAGATGGAGGATTCAG
GCTATTACTATTGTATAATGAGAACTCAACATACTGCCTCAAACTAAAATAACCATGAGTGTC
TTAGAGAATGACCCTGGCTTGTGCTATAACACACAAGCCAGCTTCATACAGCGGCTCCATGTTGC
AGGGGATGGAAGTCTTGTGTGCCCTTATCTGGATTTTTTCAAAGATGAAAATAACGAGTTACCCA
AAGTTCAGTGGTATAAGAAGTGTAAACCTCTGCCTCTTGACGATGGAACTTCTTTGGATTCAAG
AATAAACTGATGGTGATGAATGTGGCTGAAGAGCACAGAGGGAAGTATACTTGCCGCACGTCCTA
CACATAACAGGGGAAGCAATATCCCGTCACACGAGTAATAACATTTATCACAATAGATGACAGCA
AGAGGGACAGACCTGTGATTATGAGCCACGGAATGAGACGATGGAAGCTGACCCAGGATCCACG
ATACAACTGATCTGCAACGTCACGGGCCAGTTCACCGACCTTGTCTACTGGAAGTGGAAATGGGTC
GGAAATTGAATGGGACGATCCAATCCTAGCCGAAGACTATCAGTTTTTGGAAACACCTTCAGCCA
AAAGAAAGTACACTCTCATTACAACACTTAACGTTTCAGAGGTCAAAGCCAGTTTTATCGCTAT
CCGTTTCATCTGCTTCGTTAAGAACACTCATATTTCTGGAGACTGCACACGTACGGTTAGTATACCC
AGTTCCTGACTTCAAGAATTACCTCATCGGGGGCTTTGCCATCTTCACAGCTACAGCCGTGTTCT
GTGCTTGCATCTACAAAGTCTTCAAGGTTGATATAGTGCTTTGGTACAGGGACTCCTGCTCTGAT
TTTCTTCCCCCAAAGCTTCAGATGGAAAGACCTATGATGCCTATGTTCTTTATCCCAAGACCTA
CGGAGAGGGATCCTTTGCATACTTGGATACTTTTGTGTTTAAGCTGTTGCCGGAGGTCTTGGAGG
GACAGTTTGGATACAACTGTTTCAATTTGTGGAAGGGATGACTATGTTGGGGAAGATACCATCGAG
GTTACTAATGAAAACGTAAAGAGAAGCAGAAGGCTGATCATATTTTAGTGAGAGATATGGGAAG
CTTCAGCTGTCTGGGCCAGTCATCTGAAGAGCAGATAGCAATATACGATGCCCTCATCCGGGAAG
GAATTAAAATCATCCTGCTCGAGTTGGAGAAAATCCAAGACTATGAGAAAATGCCAGAATCTATT
CAATTCATTAAGCAGAAGCATGGGGCCATTTGCTGGTCAGGAGACTTTAAAGAAAGACCGCAGTC
TGCCAAGACCAGGTTCTGGAAAACTTAAGATAACCAGATGCCAGCCCCAACGGCGATCACCCTGT
CTAAACATCACTTACTAACCCTGGATCCTGTGCTGGACACTAAGGAGAACTGCAGGCGGAGACA
CACTTACCCTTGGCTAG

O controle utilizado foi o mismatch, que corresponde a mesma sequência do antisense exceto pela substituição de 6 bases (marcado em **negrito**): Mismatch: 5' – **CAGTAACTTAATCTGCA** – 3'.

Antes da administração o ODN-AS foi liofilizado e reconstituído em solução NaCl 0,9% livre de nuclease à concentração 4 µg/µL. O ODN-AS ou o mismatch foram administrados por via i.gl. (30 µg/5 µL) uma vez ao dia durante 4 dias consecutivos.

3.5 Procedimento para retirada do gânglio da raiz dorsal

Ao final dos experimentos os animais foram anestesiados (Tiopental sódico, 50 mg/kg, i.p.) para a retirada do gânglio da raiz dorsal (GRD, L5). Os ratos foram colocados em uma mesa cirúrgica própria para tricotomia da região dorso-lombar, seguida de assepsia e anti-sepsia da região com povidine iodado. Posteriormente foi feita a incisão póstero-mediana, seguida de abertura por planos até lamina óssea e feita laminectomia para expor e visualizar o GRD de L5 na sua emergência. Depois de retirados, os gânglios foram imediatamente congelados em gelo seco e estocados em -70°C até o momento do uso.

3.6 Ensaio Imuno-enzimático (ELISA)

A concentração de IL-1 β foi determinada por ensaio imuno-enzimático (ELISA), conforme previamente descrito (TAKTAK; LEE, 1991; RAMOS et al., 2005; CUNHA et al., 2005). Resumidamente, uma placa de microtitulação (96 poços) foi recoberta e incubada com o anticorpo anti-IL-1 β (2 μ g/mL) diluído em PBS durante 15-18 h a 4°C. Após esse tempo de incubação, a placa foi lavada com PBS + 0,1% de Tween 20 e bloqueada durante 1 h à temperatura ambiente com BSA 1%. Em seguida, a placa foi lavada e incubada por 12 h à 4°C com as amostras e sua respectiva curva padrão (diluições seriadas de base 2). Posteriormente, a placa foi lavada novamente e incubada com o respectivo anticorpo biotinilado anti-IL-1 β (1:1000) por 1 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada e 50 mL de avidina-HRP (1:5000; DAKO A/S, Denmark) foi adicionado a cada poço. A placa foi novamente incubada por 30 min à

temperatura ambiente, lavada, e adicionado 50 mL do substrato dihidroclorato de 1,2 fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, 200 mg/mL: Sigma) diluído em tampão fosfato contendo 0.4 mg/mL de H_2O_2 30%. Após 15 minutos a reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 1M. A leitura será realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos como picogramas (pg) de IL-1 β por GRD-L5, baseando-se na curva padrão para essa citocina.

Para a dosagem de IL-1 β no gânglio da raiz dorsal (GRD-L5), as amostras foram coletadas após a administração periférica de IL-1 β (na 3^a hora), carragenina (3^a e 5^a hora) ou CFA (6^a e 12^a hora), em tampão contendo inibidores de protease. Os grupos tratados com salina tiveram seus GRDs-L5 retirados no mesmo tempo dos grupos tratados com IL-1 β , carragenina ou CFA. As amostras (n = 3 gânglios, L5) foram trituradas com auxílio de um Polytron® (PT3100), centrifugadas (10 min, 4830 g, 4°C) e os sobrenadantes foram analisados seguindo o protocolo descrito por Cunha et al., (2005). O ensaio de ELISA baseou-se em Taktak; Lee (1991).

3.7 Western Blot

3.7.1 Extração de Proteínas de Gânglios das Raízes Dorsais

Os animais que receberam o tratamento, por via i.gl., durante 4 dias consecutivos com ODN-AS contra o receptor IL-1RI tiveram seus GRDs (L5, direito) isolados, dissecados e imediatamente colocados em gelo seco e armazenados em temperatura de -70°C até a realização dos experimentos. Os gânglios foram homogeneizados em homogenizador manual (Potter S – B. Braun Biotech International,

USA) em tampão de lise constituído de PB 50 mM (pH 7,4), β -mercaptoethanol 5%, Etilenodiaminatetracetato de Sódio (EDTA) 1 mM, SDS 1%, inibidor de protease 1%, em banho de gelo. O homogenato foi centrifugado a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1.5 mL e procedeu-se a quantificação do total de proteínas pelo método colorimétrico Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Alíquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer -70°C até serem utilizadas e a concentração escolhida para a próxima etapa foi a de 50 μ g.

3.7.2 Eletroforese e ImunoBlot

Amostras do homogenato foram desnaturadas a 100°C durante 4 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (1.5 mm de espessura) na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese segundo Laemmli (1970), utilizando-se o sistema Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). O gel de separação foi de acrilamida 12% p/v, bisacrilamida 0.3% p/v, Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8 e SDS 0.1% p/v. O gel de concentração foi de acrilamida 4% p/v, bisacrilamida 0.3% p/v, Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8 e SDS 0.1% p/v. A corrida foi feita sob voltagem constante de 100 V, utilizando-se o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM e SDS 0.1% p/v.

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose (BA-S 83, NH 03431) utilizando-se o sistema de transferência Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Após o fracionamento das proteínas, o gel e a membrana de nitrocelulose foram incubados no tampão de transferência [glicina 192 mM, Tris-Base-HCl 25 mM, pH 8.3, 20% (v/v) de metanol e 0.1% (p/v) de

SDS] por 30 minutos. Posteriormente foi montado o sistema para transferência contendo esponja, dois pedaços de papel de filtro, o gel, a membrana, dois pedaços de papel de filtro e finalmente mais uma esponja. As esponjas e os papéis de filtro foram previamente umedecidos no tampão de transferência. A transferência foi realizada sob voltagem constante de 100 V durante 1 hora e 40 minutos. As membranas foram coradas com Ponceau 0.5% em TCA 3% para certificação de que houve transferência de proteínas. Em seguida, as membranas foram lavadas com água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com uma mistura de TBS-T (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 0.05% de Tween 20) contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado por 16 horas a 4°C sob agitação contínua. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes de 5 minutos cada com TBS-t 0.05% e posteriormente incubada por 16 horas a 4° com os seguintes anticorpos primários:

- **IL-1RI** (Santa Cruz, CA – USA): IgG de Coelho. A titulação foi de 1:1000.
- **α -tubulina** (Santa Cruz, CA – USA): IgG de Mouse. A titulação foi de 1:1000.

Logo as membranas foram lavadas uma vez durante 15 minutos com TBS-T 0.05% e três vezes durante 5 minutos cada e foram incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação contínua com os seguintes anticorpos secundários:

- Anticorpo IgG de Cabra Anti-Coelho conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch, PA – USA): A titulação foi de 1:10.000.
- Anticorpo IgG de cabra Anti-Mouse conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch, PA – USA): A titulação foi de 1:10.000.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas uma vez durante 15 minutos com TBS-T 0.05% e três vezes durante 5 minutos cada para revelação por quimioluminescência. Para a revelação a membrana foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente com a mistura das soluções A e B do kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K.) como descrito no manual de instruções.

As membranas foram visualizadas em fotodocumentador (SYNGENE - Cambridge, Reino Unido) sendo as imagens capturas com uma câmera digital (SYNOPTICS) e do analisadas utilizando o “software” Gene link (SYNGENE).

Em todos os experimentos de *Western Blot* foi utilizado um padrão de peso molecular (Bio-Rad – Kaleidoscope Prestained Standards, Catalog 161-0324) com os seguintes pesos:

Myosin	Blue	197,211
B-galactosidase	Magenta	125,275
Bovine serum albumin	Green	83,426
Carbonic anhydrase	Violet	37,095
Soybean trypsin inhibitor	Orange	31,168
Lysozyme	Red	17,154
Aprotinin	Blue	6,990

Além disso, como controle negativo, as membranas foram expostas ao anticorpo secundário, que variou de acordo com o experimento, sem a presença do anticorpo primário.

3.8 Fluorescência

Os ratos receberam DAPI (marcador fluorescente para núcleos celulares, 10 μ L), salina (veículo, 50 μ L), IL-1 β (0,5 pg/50 μ L), Carragenina (100 μ g/50 μ L) ou CFA (100 μ L) por via intraplantar e após 3 horas (os ratos que receberam DAPI (10 μ L) foram perfundidos 24 horas após sua administração intraplantar), sob anestesia com associação de Xilazina (0,5 mg/kg) e Ketamina (20 mg/kg) na mesma seringa, os ratos foram perfundidos com salina 0,9% seguido de paraformaldeído 4% (PFA) tamponado com tampão fosfato 0,1M. Foram usados aproximadamente 250 mL de cada solução durante a perfusão. Em seguida foi realizada cirurgia para extração do GRD ao nível de L5, os quais, depois de extraídos, foram armazenados em solução PFA 4% na geladeira por aproximadamente 2 horas. Logo após retirou-se a solução PFA, adicionou-se solução de sacarose 30% e aguardou-se em média 48 horas até que os GRDs sedimentassem. Os tecidos foram congelados em “*optimal cutting temperature*” (OCT) e cortados em criostato (12 μ m). Antes do ensaio de fluorescência, as lâminas foram colocadas em estufa com vácuo por aproximadamente 2 horas, para melhor adesão dos cortes às lâminas. As lâminas relativas aos ratos que receberam DAPI intraplantar, neste passo, foram montadas com PBS + Glicerol e avaliadas no microscópio. Para as lâminas relativas ao tratamento intraplantar com salina, carragenina ou CFA, logo após as mesmas serem retiradas da estufa com vácuo, foram lavadas 2 vezes em PBS. As lâminas foram submersas em PBS + glicina 0,1M por 30 minutos. Em seguida realizou-se o bloqueio e permeabilização com PBS + BSA 2% e triton X100 à 0,2% por 1 hora. O anticorpo primário foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente em PBS + BSA 1% + triton X100 0,1%. O anticorpo primário foi

diluído na seguinte proporção: IRAK-1 (1:200), IRAK-4 (1:200) e TRPV1 (1:500). Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS + BSA 1%. Seqüencialmente, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos, sendo este processo repetido 5 vezes. Antes de incubar as lâminas com o anticorpo secundário diluído na proporção de: 1:400 (IRAK-1) 1:400 (IRAK-4), 1:400 (GFAP IgG Cabra), 1:2000 (GFAP IgG Coelho) e 1:1000 (TRPV1) os mesmos foram centrifugados a 10000 RPM por 10 minutos. A incubação dos anticorpos secundários foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora em PBS contendo 1% de BSA. Em seguida as lâminas foram lavadas, para retirar o excesso de anticorpo secundário, por 5 vezes com PBS. Finalmente, as lâminas foram montadas com PBS + Glicerol. As imagens de marcação com os anticorpos secundários conjugados: Alexa 488 e Alexa 584 foram obtidas através de microscopia de fluorescência (Leica IBM 6000).

Anticorpos Primários:

- Anticorpo contra COX-1 – policlonal em IgG de Cabra - Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA);
- Anticorpo contra COX-2 – policlonal em IgG de Coelho – Cayman Chemical (Michigan, USA);
- Anticorpo contra IRAK-1 – policlonal em IgG de Coelho – Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA);
- Anticorpo IRAK-4 – policlonal em IgG de Cabra – Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA)
- Anticorpo TRPV1 – policlonal em IgG de Cabra - Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA)

- Anticorpo GFAP – policlonal em IgG de Cabra - Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA)
- Anticorpo GFAP – policlonal em IgG de Coelho – Dako (Carpinteria, CA, USA).

Anticorpos Secundários:

- 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) – Molecular Probes Califórnia (Oregon, USA).
- Anticorpo conjugado a Alexa 584 – anticorpo de jumento contra IgG de Cabra - Invitrogen (Oregon, USA).
- Anticorpo conjugado a Alexa 488 – anticorpo de jumento contra IgG de Coelho - Invitrogen (Oregon, USA).

3.9 Análise estatística

Para determinar as diferenças (o nível de significância foi de $p < 0,05$) entre os grupos estudados, utilizamos ANOVA de uma via ou teste-t não-pareado. A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *Graph Pad Prism 4.0* e os resultados foram representados como a média $\pm$ erro padrão da média em grupos de 5 ratos para os estudos comportamentais e grupos de 3 ratos nos estudos bioquímicos. A análise das curvas obtidas foi feita pelo teste de análise de variância ANOVA de uma via seguido de Teste Bonferroni para as comparações múltiplas. As imagens obtidas por microscopia foram transformadas e quantificadas usando o software de domínio público *ImageJ* (NIH).

4. RESULTADOS

4.1 Administração de Carragenina ou Adjuvante Completo de Freund (CFA) no tecido periférico induz aumento da concentração de IL-1 β no gânglio da raiz dorsal

Para avaliar se o efeito da administração intraganglionar de IL-1 β reflete ou não uma condição inflamatória, Carragenina (Cg, 100 μ g/50 μ L - FERREIRA et al., 1993) ou Adjuvante Completo de Freund (CFA, 100 μ L - MA; WOOLF, 1996) foram administrados no tecido periférico da pata de ratos e foram verificadas as concentrações de IL-1 β no GRD após a administração desses agentes inflamatórios.

Como demonstrado na **Figura 5**, 3 horas após a administração de Cg, não houve aumento significativo nas concentrações de IL-1 β no GRD comparado ao grupo-controle, salina. Porém na 5ª hora após a administração de Cg (ALEY et al., 2000), foi detectado aumento significativo nas concentrações de IL-1 β no GRD. Após a administração intraplantar de CFA, detectou-se aumento nas concentrações de IL-1 β no gânglio da raiz dorsal na 6ª e 12ª hora (SOIGNIER, et al., 2011, **Figura 5**).

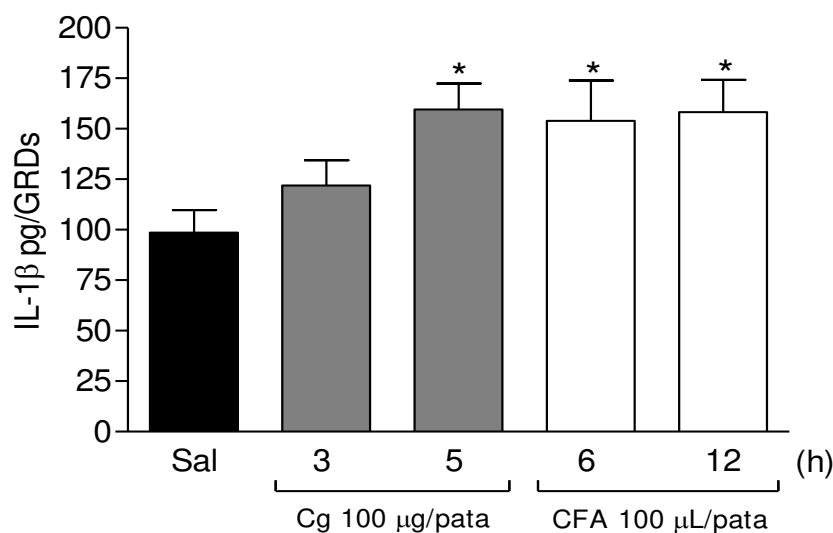


Figura 5: Concentração de IL-1 β no GRD-L5 após a administração intraplantar de Carragenina (Cg) ou Adjuvante Completo de Freund - CFA. O GRD-L5 foi coletado na 3^a e 5^a hora e na 6^a e 12^a hora após a administração i.pl. de carragenina (Cg - 100 µg/50 µL) ou Adjuvante Completo de Freund CFA (CFA - 100 µL), respectivamente. O grupo que recebeu salina intraplantar teve o GRD-L5 coletado na 3^a hora e a concentração de IL-1 β foi determinada por ensaio imuno-enzimático (ELISA). As barras representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * indica diferença ($p < 0.05$) do grupo estimulado com Cg ou CFA e do grupo estimulado com salina (Sal).

4.2 Pré-tratamento com IL-1Ra (antagonista natural do receptor de IL-1 β) no gânglio da raiz dorsal reduz a hiperalgesia mecânica induzida pela administração de CFA e carragenina no tecido periférico.

Ratos foram pré-tratados com IL-1Ra, antagonista natural do receptor de IL-1 β , no GRD L5, nas doses de 6 e 20 μ g (5 μ L), 30 minutos antes da administração intraplantar de Adjuvante Completo de Freund – CFA (100 μ L - LEE et al., 2004; MA; WOOLF, 1996; IGWE; NING, 1994). A hiperalgesia foi avaliada, em três diferentes tempos (1.5, 3 e 6 horas, LEE et al., 2004) após a administração de CFA. Observou-se que tanto a dose de 6 μ g quanto a dose de 20 μ g de IL-1Ra foram capazes de reduzir significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela administração periférica de CFA em todos os tempos medidos. A administração do veículo (salina) não alterou o limiar nociceptivo dos animais (**Figura 6A**).

Apenas a dose efetiva de 6 μ g de IL-1Ra (LEE et al., 2004) foi utilizada nos próximos experimentos.

Ratos foram tratados com IL-1Ra (6 μ g/5 μ L, LEE et al., 2004) intraganglionarmente e após 30 minutos a carragenina (Cg – 100 μ g/100 μ L - FERREIRA et al., 1993) foi administrada na pata. Como observado na **Figura 6B**, a hiperalgesia foi significativamente reduzida nos tempos de 3 e 5 horas (ALEY et. al, 2000) após a administração de Cg.

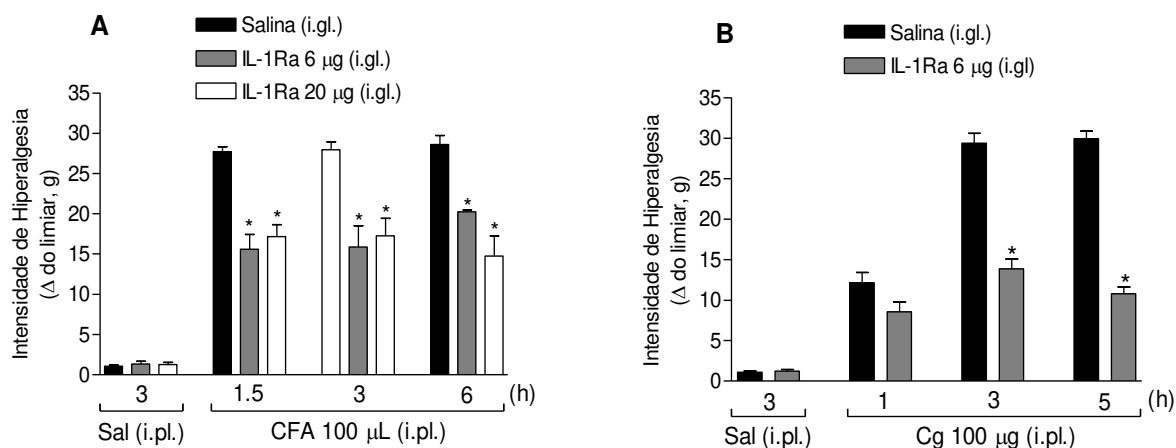


Figura 6: Efeito do pré-tratamento intraganglionar com IL-1Ra (antagonista natural do receptor de IL-1 β) sobre a hiperalgesia mecânica aguda induzida pela administração intraplantar de CFA ou carragenina. O IL-1Ra (6 ou 20 μ g) ou veículo (salina) foram administrados no GRD-L5, em volume de 5 μ L, 30 minutos antes da administração i.pl. de CFA (100 μ L) (**painel A**) ou carragenina (100 μ g/100 μ L) (**painel B**). A intensidade de hiperalgesia foi avaliada na 1,5^a, 3^a e 6^a hora após a administração de CFA e na 1^a, 3^a e 5^a hora após a administração de carragenina no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * indica diferença estatística ($p < 0.001$) entre os grupos pré-tratados com IL-1Ra (i.gl.) e os grupos pré-tratados com veículo (salina, i.gl.).

4.3 Pré-tratamento com IL-1Ra no gânglio da raiz dorsal reduz a hiperalgesia mecânica do tecido periférico induzida pela administração de IL-1 β no gânglio da raiz dorsal.

Ratos foram tratados com IL-1Ra (6 μ g/5 μ L), por via intraganglionar, e após 30 minutos IL-1 β (0,5 pg – POOLE et al., 1995; FERREIRA et al., 1988) foi administrada também no GRD-L5. A hiperalgesia mecânica foi avaliada na 3^a hora após administração de IL-1 β . Como demonstrado na **Figura 7**, o IL-1Ra inibiu, em torno de 56%, a hiperalgesia mecânica induzida pela IL-1 β no GRD-L5. A administração do veículo (salina) não alterou o limiar nociceptivo dos animais (**Figura 7**).

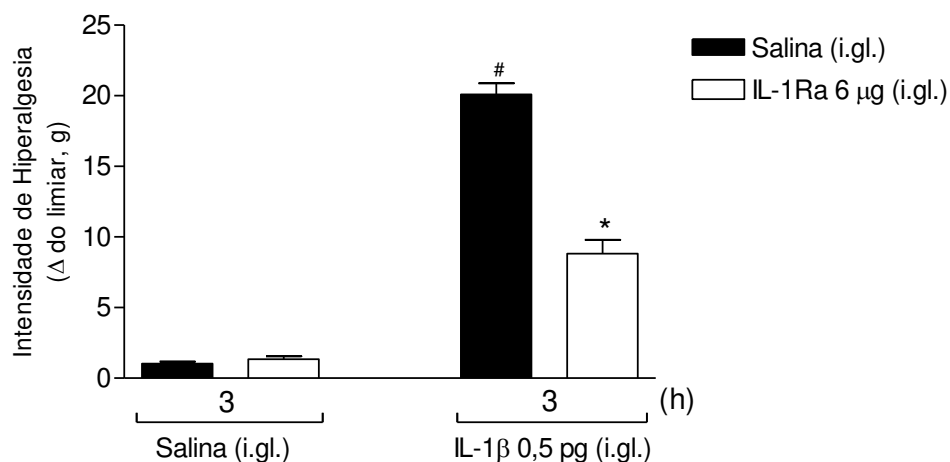


Figura 7: Efeito do pré-tratamento intraganglionar (L5) com IL-1Ra sobre a hiperalgisia mecânica induzida pela administração intraganglionar de IL-1 β . O IL-1Ra (6 μ g) ou veículo (salina) foram administrados no GRD-L5, em volume de 5 μ L, 30 minutos antes da administração i.gl. de IL-1 β (0,5 pg/5 μ L). A intensidade de hiperalgisia foi avaliada na 3ª hora, após a administração de IL-1 β (i.gl.), no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. # indica diferença estatística ($p < 0.001$) entre o grupo tratado com salina (i.gl.) $\rightarrow$ Salina (i.gl.) e o grupo tratado com salina (i.gl.) $\rightarrow$ IL-1 β (i.gl.). * indica diferença estatística ($p < 0.001$) entre o grupo tratado com Salina (i.gl.) $\rightarrow$ IL-1 β (i.gl.) e o grupo tratado com IL-1Ra (i.gl.) $\rightarrow$ IL-1 β (i.gl.).

4.4 Efeito do tratamento intraganglionar (L5) com antisense oligodeoxinucleotídeo (ODN-AS) contra o receptor de Interleucina-1 β (IL-1RI) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela administração periférica de CFA, Carragenina, IL-1 β ou PGE₂.

Para confirmar a importância da ativação do receptor para IL-1 β (IL-1RI) no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico o GRD-L5 foi tratado com oligodeoxinucleotídeos antisense (ODN-AS) contra o receptor de IL-1 β (IL-1RI). O tratamento por via intraganglionar com ODN-AS (AS, 30 μ g/5 μ L/dia), mismatch (MIS, 30 μ g/5 μ L/dia) ou salina (5 μ L/dia) foi realizado durante 4 dias consecutivos (uma vez ao dia). Quinze horas após a última administração de salina, ODN-AS ou mismatch, os animais receberam uma injeção intraplantar de CFA (**Figura 8A**, 100 μ L), Carragenina (**Figura 8B**, 100 μ g/50 μ L), IL-1 β (**Figura 8C**, 0,5 pg/50 μ L) ou PGE₂ (**Figura 8D**, 100 ng/50 μ L - FERREIRA et al., 1978). A hiperalgesia mecânica foi avaliada na 3ª hora após a administração periférica dos estímulos nociceptivos através do von Frey eletrônico. O tratamento i.gl. com ODN-AS contra IL-1RI inibiu, de maneira significativa, a resposta hiperalgésica induzida pela administração intraplantar de CFA (**Figura 8A**, 67 e 68%), Carragenina (**Figura 8B**, 74 e 73%) e IL-1 β (**Figura 8C**, 63 e 61%), quando comparado ao grupo pré-tratado com salina ou mismatch (respectivamente), mas não pela administração de PGE₂ (**Figura 8D**), quando comparado aos grupos tratados com salina ou mismatch.

O ODN-AS, mas não ODN-mismatch, reduziu significativamente a expressão da proteína IL-1RI (80 kDa) (**Figura 8E e 8F**) no GRD-L5, analisada pela técnica de Western Blot, utilizando a expressão de α -tubulina (50 kDa) como controle.

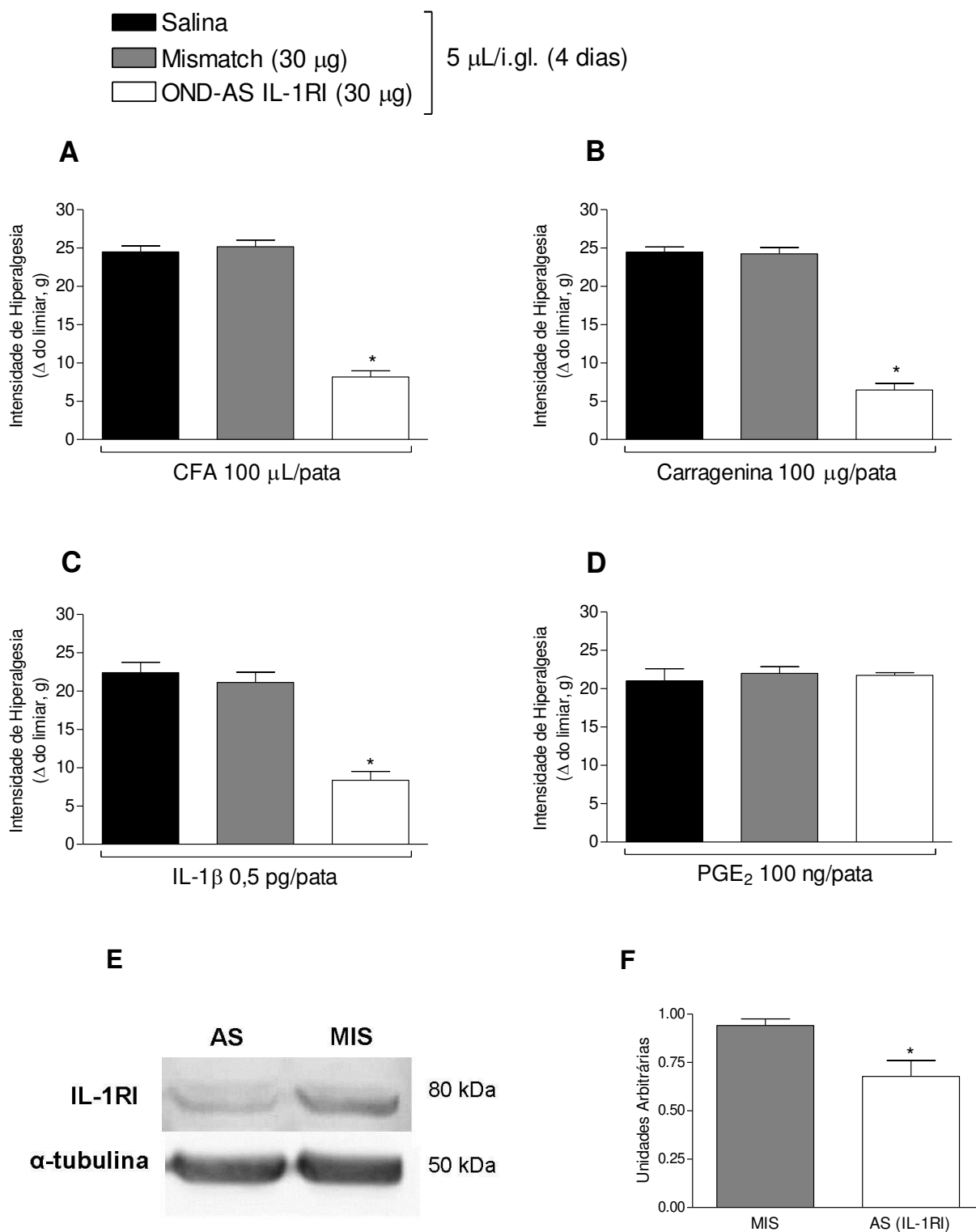


Figura 8. Efeito do tratamento intraganglionar (L5) com antisense oligodeoxinucleotídeo (ODN-AS) contra IL-1RI sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA, Carragenina, IL-1 β ou PGE₂. Salina, ODN-AS contra IL-1RI (AS, 30 μ g) ou mismatch (MIS, 30 μ g) foram administrados no GRD-L5 durante 4 dias consecutivos, uma vez ao dia, em volume de 5 μ L. Quinze horas após a última administração de salina, ODN-AS ou mismatch, os

animais foram tratados com CFA (100 μ L, **painel A**), Carragenina (100 μ g/50 μ L, **painel B**), IL-1 β (0,5 pg/50 μ L, **painel C**) ou PGE₂ (100 ng/ 50 μ L, **painel D**) na pata direita traseira. Na terceira hora após os estímulos inflamatórios o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado através do von Frey eletrônico. As barras representam a média $\pm$ epm de 5 animais por grupo. * indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre o grupo tratado com ODN-AS contra IL-1RI e os grupos tratados com salina ou mismatch (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni). Os GRDs-L5 (que receberam o tratamento com ODN-AS ou mismatch) desses animais foram retirados e a expressão de IL-1RI (80 kDa), em 50 μ g dessa amostra, foi avaliada (**painel E**) e quantificada (**painel F**) tendo como controle a expressão de α -tubulina (50 kDa). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo tratado com ODN-AS contra IL-1RI e o grupo tratado com mismatch ("unpaired t-test").

4.5 Importância da ativação do receptor neuronal IL-1RI do tecido periférico para a hiperalgesia inflamatória.

Araldi et al., (2007) demonstraram que a liberação de IL-1 β no tecido periférico leva à liberação de Prostaglandinas (PGs) as quais sensibilizam os Neurônios Nociceptivos Primários (NNPs) por agirem diretamente em receptores EP neuronais. O tratamento intraganglionar com ODN-AS contra o receptor IL-1RI inibiu a hiperalgesia induzida por CFA, Carragenina e IL-1 β , mas não PGE₂, administrados na pata (ver **Figura 8**). Estes dados sugerem que a ativação do receptor IL-1RI neuronal no tecido periférico tenha papel fundamental na hiperalgesia induzida por agentes inflamatórios, os quais liberam IL-1 β . Para testar esta hipótese, IL-1 β (0,5 pg/50 μ L) foi co-administrada com a dose sub-limiar de PGE₂ (10 ng/pata) em ratos pré-tratados (30 min.) com indometacina (100 μ g/50 μ L - FERREIRA et al., 1993) na pata. Este dado demonstra que a ativação do receptor IL-1RI pela IL-1 β , embora não sensibilize os NNP por si só, é fundamental para o desenvolvimento da hiperalgesia induzida pela prostaglandina liberada endógenamente durante a inflamação do tecido periférico (“*priming*” hiperalgésico). Como podemos observar na **Figura 9 (barras pretas)**, o pré-tratamento i.pl. com indometacina (Indo, 100 μ g/50 μ L) foi capaz de inibir significativamente a hiperalgesia induzida pela IL-1 β (0,5 pg/50 μ L) intraplantar, mas não a co-administração de IL-1 β (0,5 pg) e a dose sub-limiar de PGE₂ (10 ng/pata).

4.6 Importância da liberação de prostaglandinas no GRD no desenvolvimento do “*priming*” hiperalgésico.

De modo semelhante à ação da IL-1 β como mediador inflamatório do tecido periférico, com a função de neuromodulação no GRD, a IL-1 β também induz a liberação de prostaglandinas. A administração de indometacina (Indo, 100 μ g/5 μ L, ARALDI et al., 2007) no GRD-L5 preveniu completamente o desenvolvimento do “*priming*” hiperalgésico induzido pela IL-1 β no tecido periférico (**Figura 9, barras brancas**). Também demonstramos que a indometacina (20 mg/kg), administrada por via intraperitoneal (i.p.) (**Figura 9, barra cinza**) reduziu, significativamente o “*priming*” hiperalgésico, devido ao fato que, quando administramos uma droga, sistemicamente, essa também tem ação no GRD. A hiperalgesia foi avaliada na 3^a hora após a co-administração de IL-1 β e 10 ng de PGE₂ (dose sub-limiar) através do von Frey eletrônico.

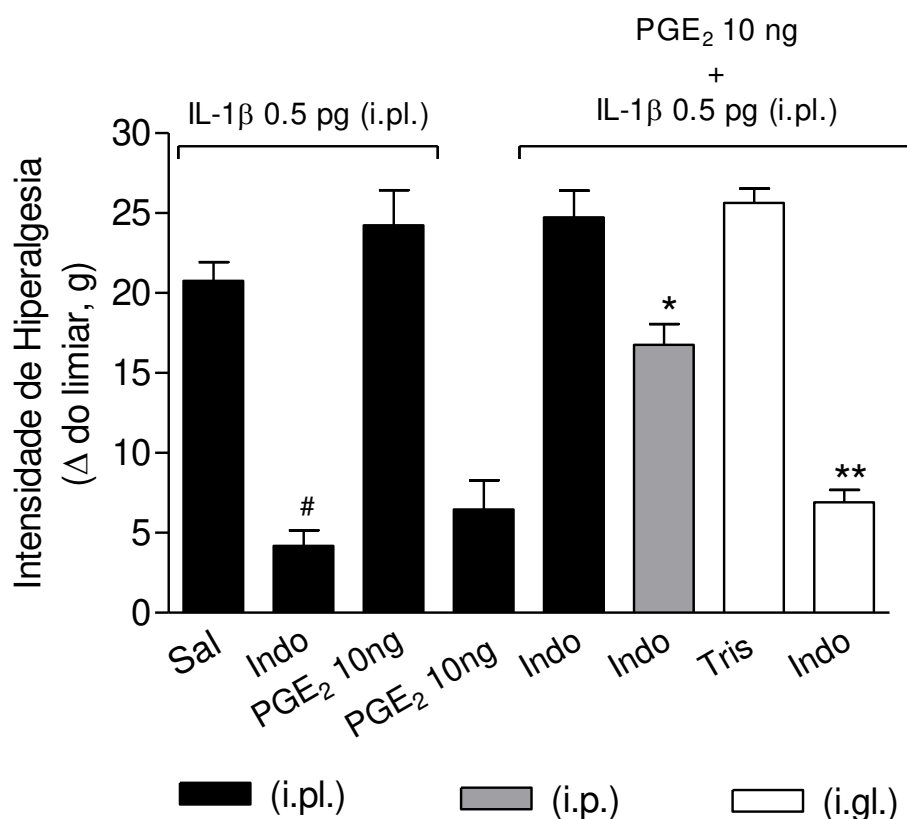


Figura 9. Efeito da administração de indometacina sobre o “priming” hiperalgésico. Indometacina (Indo, i.pl. 100 µg/50 µL, i.p.; 25 mg/kg or i.gl.; 100 µg/5 µL), seu veículo Tris-HCl (Tris, 5 µL) ou salina (Sal, 50 µL) foram administrados 30 min antes da injeção intraplantar de IL-1β (0.5 pg/25 µL), PGE₂ (10 ng/25 µL) ou a combinação PGE₂ (10 ng) + IL-1β (0.5 pg). A medida do limiar de retirada de pata à estimulação mecânica foi realizada na 3ª hora no teste de pressão crescente na pata de ratos (von Frey eletrônico). As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. # indica $p < 0,05$ em relação aos grupos salina+IL-1β e Indo (i.pl.) + IL-1β. * indica $p < 0,001$ em relação aos grupos Indo (i.p.) + PGE₂+IL-1β e PGE₂+IL-1β. ** indica $p < 0,001$ em relação aos grupos Indo (i.gl.) + PGE₂+IL-1β, Tris (i.gl.) + PGE₂+IL-1β e PGE₂+IL-1β (one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni).

4.7 Importância da ativação dos receptores IL-1RI do GRD para o “*priming*” hiperalgésico.

Para testarmos a hipótese que além da ativação dos receptores IL-1RI neuronais do tecido periférico, a ativação dos receptores IL-1RI do GRD são importantes para o “*priming*” hiperalgésico, ratos foram tratados com ODN-AS contra IL-1RI (30 µg/5 µL/dia, durante 4 dias) ou IL-1Ra (6 µg/5 µL) no GRD-L5.

GRD-L5 foram tratados com ODN-AS contra IL-1RI (AS, 30 µg/5 µL/dia), mismatch (Mis, 30 µg/5 µL/dia) ou salina (5 µL/dia) durante 4 dias consecutivos (uma vez ao dia). Quinze horas após a última administração de salina, ODN-AS ou mismatch, os animais receberam uma injeção intraplantar de indometacina (100 µg/50 µL) e após 30 minutos os ratos receberam, na mesma pata, a administração concomitante de PGE₂ (10 ng) e IL-1β (0,5 pg/50 µL). Na 3ª hora após a administração dos estímulos inflamatórios, a hiperalgesia mecânica foi avaliada através do von Frey eletrônico. Observamos, na **Figura 10**, que o ODN-AS contra o receptor IL-1RI, inibiu significativamente (em torno de 74%) o “*priming*” hiperalgésico.

Outro grupo, foi pré-tratado diretamente no GRD-L5 com IL-1Ra (6 µg/5 µL) ou salina (5 µL) e após 30 min, as patas desses animais foram tratadas com indometacina (100 µg/50 µL), recebendo, as mesmas, após 30 min, a administração concomitante de PGE₂ (10 ng) e IL-1β (0,5 pg/50 µL). O antagonista de receptor de IL-1β (IL-1Ra) foi capaz de inibir, significativamente (em torno de 45%), o “*priming*” hiperalgésico induzido pela IL-1β do tecido periférico (**Figura 10**).

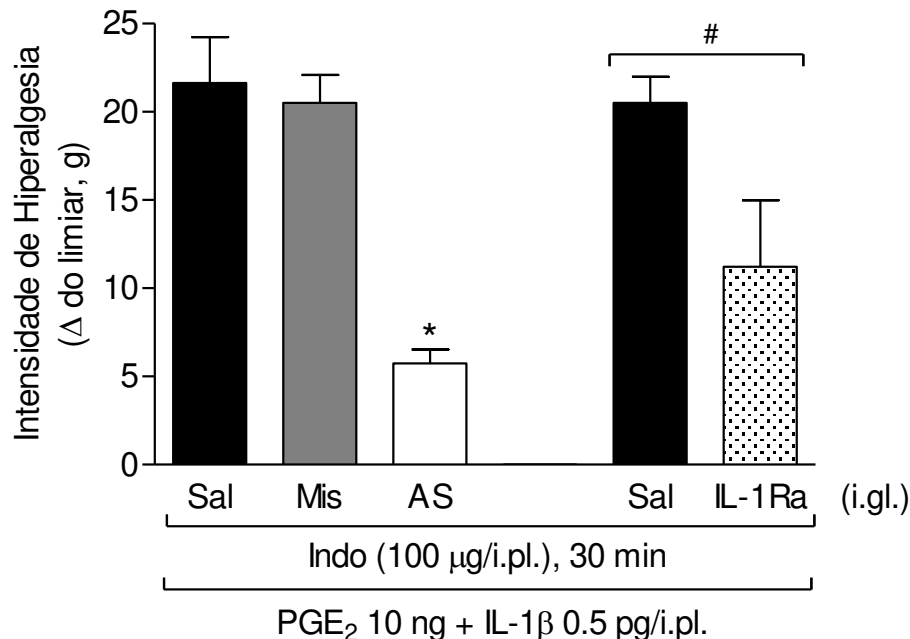


Figura 10. Efeito do pré-tratamento intraganglionar com IL-1Ra ou ODN-AS contra IL-1RI sobre o “priming” hiperalgésico. Salina (Sal, 5 µL), ODN-AS contra IL-1RI (AS, 30 µg/5 µL) ou mismatch (Mis, 30 µg/5 µL) foram administrados no GRD-L5 durante 4 dias consecutivos, uma vez ao dia, em volume de 5 µL. Quinze horas após a última administração de salina, ODN-AS ou mismatch, os animais foram tratados, por via i.pl., com indometacina (Indo, 100 µg/50 µL) e, após 30 min, os mesmos receberam a administração intraplantar de PGE₂ (10 ng)+IL-1β (0,5 pg/50 µL). Outro grupo de ratos, foi pré-tratado, por via intraganglionar, com IL-1Ra (6 µg/5 µL) ou Salina (Sal, 5 µL) e após 30 min foi administrado, por via i.pl., Indo (100 µg/50 µL) e após 30 min, através da mesma via, foi co-administrado PGE₂ (10 ng)+IL-1β (0,5 pg/50 µL). Na terceira hora após os estímulos (PGE₂ (10 ng)+IL-1β (0,5 pg/50 µL)) o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado através do von Frey eletrônico. As barras representam a média ± epm de 5 animais por grupo. * indica diferença estatística ($p < 0,05$, one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni) entre o grupo tratado com ODN-AS contra IL-1RI e os grupos tratados com salina (sal) ou mismatch (Mis). # indica diferença estatística ($p < 0,05$, unpaired t-test) entre o grupo tratado com IL-1Ra e o grupo tratado com Salina (Sal).

4.8 Carragenina ou CFA administrados no tecido periférico aumentam a expressão da proteína IRAK-1 nas células neuronais do GRD-L5 e a marcação com GFAP confirma a presença desta proteína em células satélites

A via de sinalização da IL-1 β inclui a ativação da Quinase Associada ao Receptor de IL-1 (IRAK), sendo assim, este experimento teve como objetivo pesquisar qual ou quais células estariam envolvidas na ação da IL-1 β liberada no GRD durante inflamação do tecido periférico.

Como mostrado na **Figura 11**, a administração de carragenina ou CFA na pata de ratos aumentou a expressão de IRAK-1 em células neuronais do GRD-L5 que expressam TRPV-1. Este dado sugere que a IL-1 β ativa os receptores IL-1R1 das fibras C.

A expressão de IRAK-1 em células satélites também foi confirmada através da marcação com GFAP (marcador de células gliais) em ratos que tiveram a pata tratada com carragenina (**Figura 12 - K, L e M**).

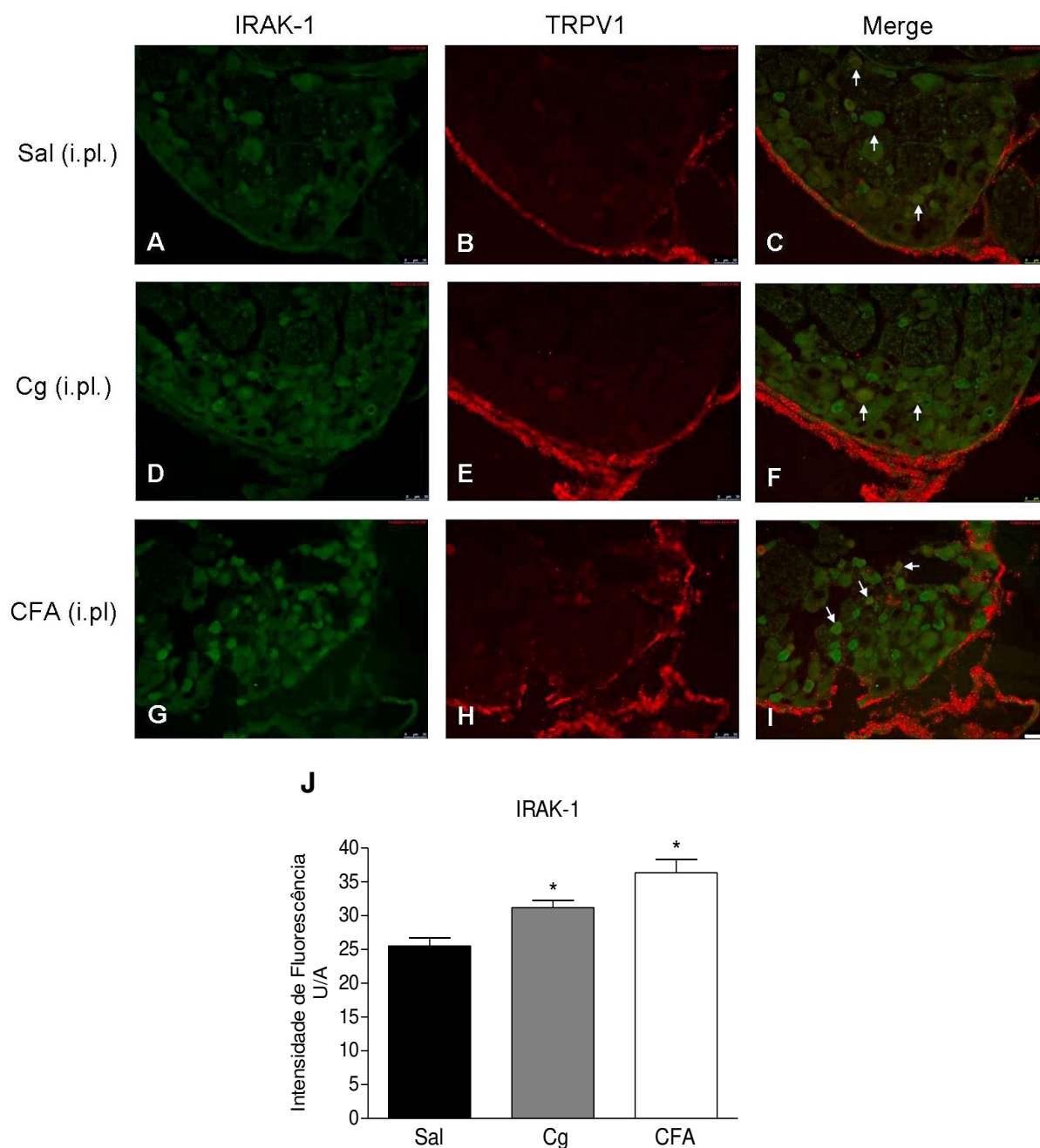


Figura 11. Efeito da administração intraplantar de Salina, Carragenina ou CFA sobre a expressão de IRAK-1 em células do GRD-L5. Painéis **A**, **B** e **C**, representam o tratamento intraplantar com salina (50 μ L) (painel **A** – marcação para IRAK-1, painel **B** – marcação para TRPV1 e painel **C** – sobreposição). Painéis **D**, **E** e **F** representam o tratamento intraplantar com Carragenina (100 μ g/50 μ L) (painel **D** – marcação para IRAK-1, painel **E** – marcação para TRPV1 e painel **F** – sobreposição). Painéis **G**, **H** e **I** representam o tratamento intraplantar com CFA (100 μ L) (painel **G** – marcação para IRAK-1, painel **H** – marcação para TRPV1 e painel **I** – sobreposição). O gráfico (**J**) apresentado representa a diferença de intensidade de fluorescência entre os neurônios dos GRDs (L5). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM de 10 neurônios por lâmina, 3 ratos para cada grupo. * indica diferença estatística ($p < 0,01$, unpaired t-test). Escala de 50 μ m e aumento de 20x.

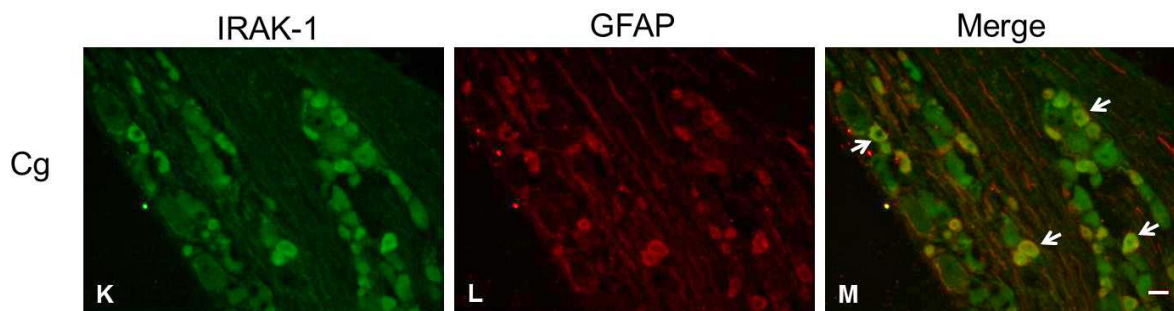


Figura 12. Efeito da administração intraplantar de carragenina sobre a expressão de IRAK-1 em células satélites. Os painéis **K** e **L** representam o tratamento intraplantar com carragenina (100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) (painel **K** – marcação para IRAK-1, painel **L** – marcação para GFAP e painel **M** – sobreposição). As setas brancas no painel **M** demonstram a sobreposição da marcação para IRAK-1 e GFAP. Escala de 50 μm e aumento de 20x.

4.9 Carragenina administrada no tecido periférico aumenta a expressão da proteína IRAK-4 nas células neuronais do GRD-L5 e a marcação com GFAP confirma a presença desta proteína em células satélites

Como descrito no item 4.9, este experimento teve como objetivo verificar se a proteína IRAK-4 é expressa nas células do GRD que estariam envolvidas na ação da IL-1 β liberada no GRD durante a inflamação do tecido periférico.

Como mostrado na **Figura 13**, a administração de carragenina na pata de ratos aumentou a expressão de IRAK-4 em células presentes no GRD-L5 sendo estas células satélites do GRD-L5 e células neuronais.

A expressão de IRAK-4 em células nociceptivas foi confirmada através da marcação com TRPV1 em cortes de GRD-L5 de ratos que tiveram a pata tratada com Carragenina (**Figura 14 – G e H**). Através deste dado podemos sugerir que a IL-1 β ativa os receptores IL-1R1 das fibras C.

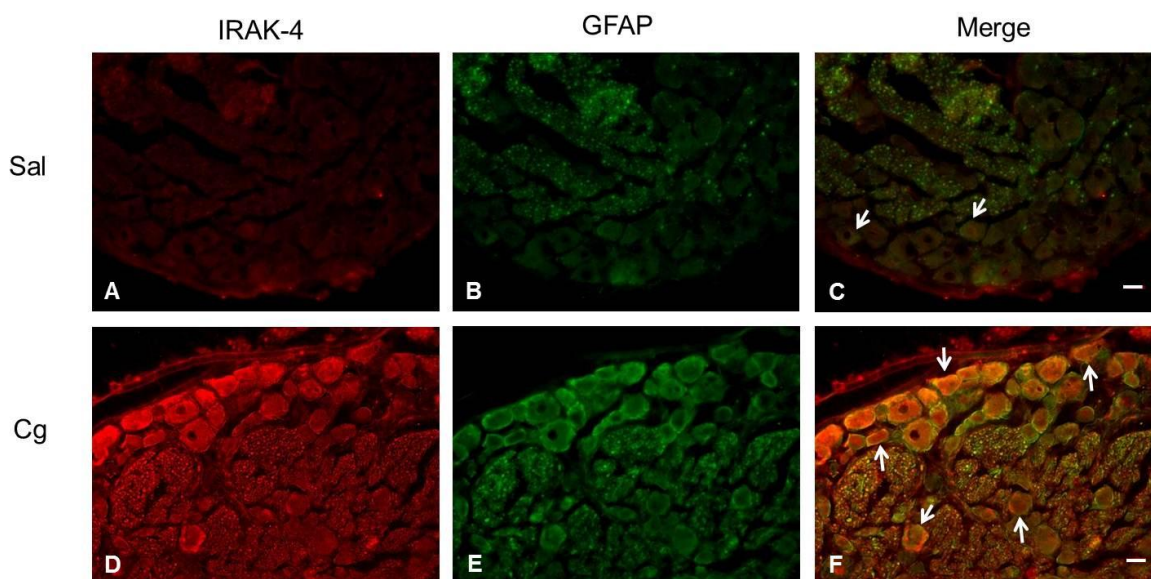


Figura 13. Efeito da administração intraplantar de Salina ou Carragenina sobre a expressão de IRAK-4 em células do GRD-L5. Painéis **A**, **B** e **C**, representam o tratamento intraplantar com salina (50 μ L) (painel **A** – marcação para IRAK-4, painel **B** – marcação para GFAP e painel **C** – sobreposição). Painéis **D**, **E** e **F** representam o tratamento intraplantar com Carragenina (100 μ g/50 μ L) (painel **D** – marcação para IRAK-4, painel **E** – marcação para GFAP e painel **F** – sobreposição). As setas brancas indicam a sobreposição da expressão de IRAK-4 e GFAP. Escala de 50 μ m e aumento de 20x.

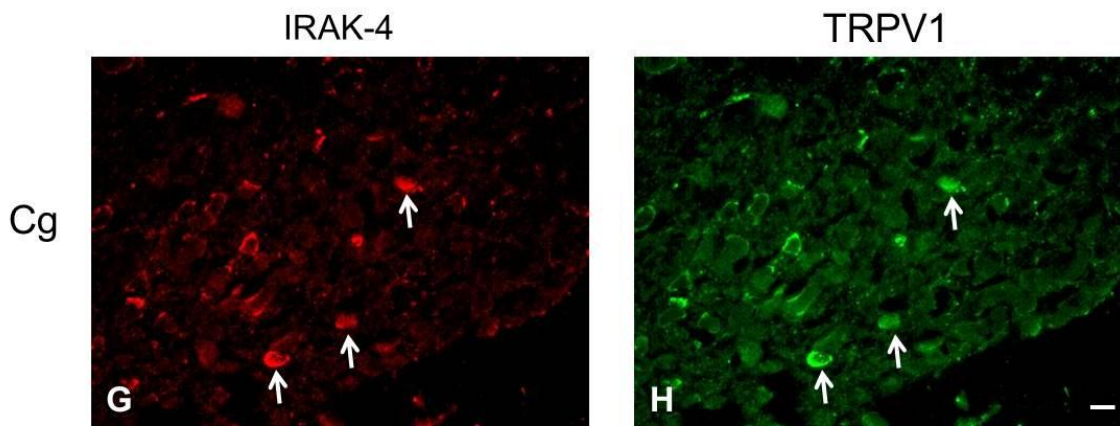


Figura 14. Efeito da administração intraplantar de Carragenina sobre a expressão de IRAK-4 em células TRPV1 positivas. Os painéis **G** e **H** representam o tratamento intraplantar com Carragenina (Cg, 100 μ g/50 μ L) (painel **G** – marcação para IRAK-4 e painel **H** – marcação para TRPV1). As setas brancas indicam que a IRAK-4 é expressa nas mesmas células que expressam TRPV1. Escala de 50 μ m e aumento de 20x.

4.10 Inflamação do tecido periférico aumenta a expressão de COX-2 em fibras nociceptivas tipo C via liberação de IL-1 β no GRD.

Para demonstrar que a IL-1 β liberada no GRD durante inflamação do tecido periférico induz a síntese de prostaglandinas no GRD associada ao desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, antagonista natural do receptor de IL-1 β (IL-1Ra, 6 μ g/5 μ L) foi administrado no GRD-L5 30 minutos antes dos agentes inflamatórios Carragenina (100 μ g/50 μ L) ou CFA (100 μ L) serem administrados na pata de ratos. Após 3 horas os GRDs-L5 foram retirados para análise da expressão de COX-2. O pré-tratamento com IL-1Ra no DRG-L5, reduziu significativamente a expressão de COX-2, após o respectivo campo periférico ter recebido Cg (**Figura 15, painel D**) ou CFA (**Figura 16, painel D**) quando comparados ao grupo controle. A co-expressão da COX-2 com células TRPV1⁺ sugere que o aumento da síntese de prostaglandinas ocorre sobretudo em fibras tipo C (**Figura 15 e 16, painéis C e F**).

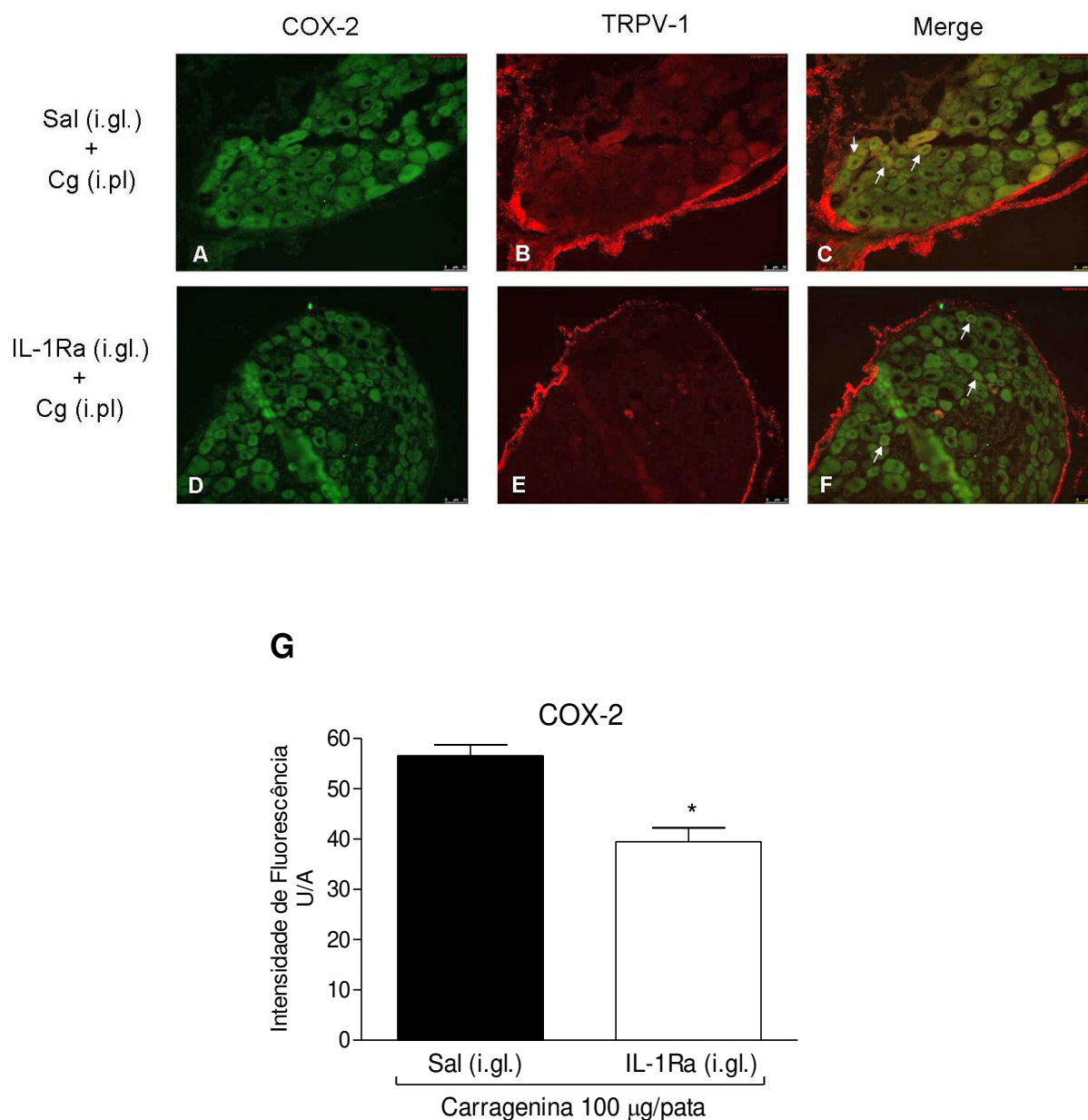


Figura 15. Efeito do pré-tratamento intraganglionar de IL-1Ra sobre a administração intraplantar de Carragenina sobre a expressão de COX-2 em células do GRD-L5. Painéis **A** e **D**, representam o pré-tratamento intraganglionar com salina (**painel A**, 5 µL) ou IL-1Ra (**painel D**, 6 µg/5 µL) 30 minutos antes da administração intraplantar de Cg (100 µg/50 µL) e a marcação para COX-2 nas células do GRD-L5. **Painéis B** e **D** representam a marcação para TRPV-1 e os **painéis C** e **F** representam a sobreposição. O gráfico **G** representa a diferença de intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) entre os neurônios dos GRDs (L5). Dados estão expressos como média $\pm$ EPM de 10 neurônios por lâmina, 3 ratos por grupo. * indica diferença estatística ($p < 0,01$, teste-t não-pareado). Escala de 50 µm e aumento de 20x.

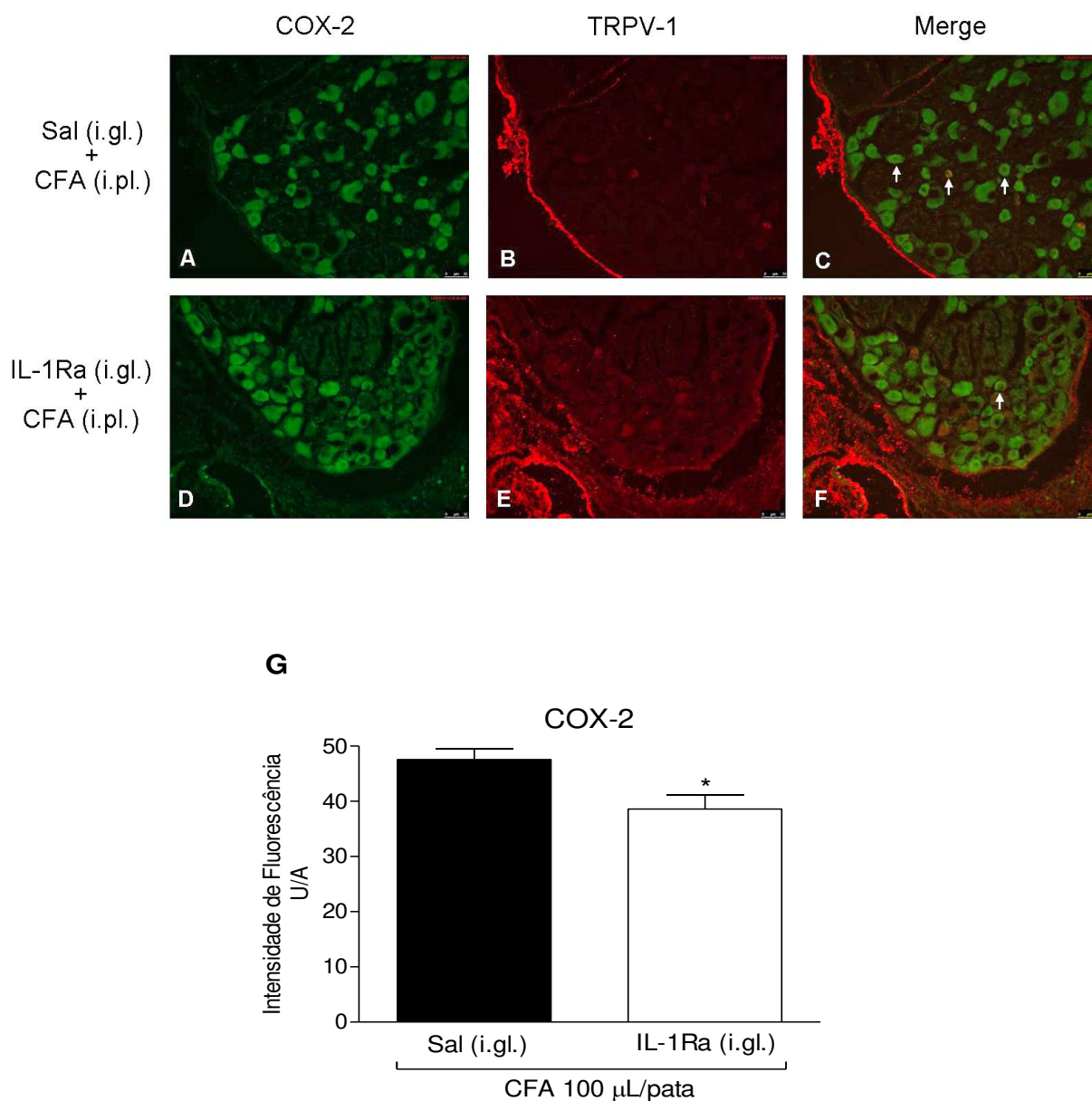


Figura 16. Efeito do pré-tratamento no GRD-L5 com IL-1Ra sobre a expressão de COX-2 em células do GRD de ratos que receberam CFA na pata. Painéis A e D, representam o pré-tratamento intraganglionar com salina (painel A, 5 µL) ou IL-1Ra (painel D, 6 µg/5 µL) 30 minutos antes da administração intraplantar de CFA (100 µL/i.pl.) e a marcação para COX-2 nas células do GRD-L5. Painéis B e E representam a marcação para TRPV-1 e os painéis C e F representam a sobreposição. O gráfico (G) apresentado representa a diferença de intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) entre os neurônios dos GRDs (L5). Dados estão expressos como média ± EPM de 10 neurônios por lâmina, 3 ratos para cada grupo. * indica diferença estatística ($p < 0,01$, unpaired t-test). Escala de 50 µm e aumento de 20x.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a participação da IL-1 β produzida no gânglio da raiz dorsal (GRD) no estabelecimento da hiperalgesia inflamatória.

A sensibilização dos nociceptores é um fator preponderante para a instalação da hiperalgesia inflamatória. As PGs são produzidas pela ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico, cuja ativação ocorre por estímulos mecânicos, químicos ou infecciosos (FERREIRA; VANE, 1967). As prostaglandinas (principalmente as da série E), assim como as aminas simpatomiméticas, sensibilizam diretamente os nociceptores, sendo que vários estímulos são capazes de induzir a liberação desses mediadores, porém a liberação de prostaglandinas parece estar diretamente relacionada à liberação de IL-1 β durante os processos inflamatórios do tecido periférico (revisado por POOLE et al., 1999). Perifericamente, a IL-1 β induz hiperalgesia inflamatória pela ativação da enzima ciclooxigenase (COX) e conseqüente produção de prostaglandinas (PGs) (FERREIRA et al., 1988). Entretanto, há dados na literatura demonstrando que a administração central dessa citocina pode induzir efeito nociceptivo (OKA et al., 1993; FALCHI et al., 2001; REEVE et al., 2000).

A primeira indicação do efeito hiperalgésico da IL-1 foi demonstrada por Ferreira et al., (1988). A administração no tecido periférico de IL-1 β induz hiperalgesia mecânica em patas de ratos, que é prevenida por inibidores de COX, como indometacina. Além disso, utilizando anticorpo anti-IL-1 β foi demonstrado que ocorre redução na hiperalgesia induzida pela administração de carragenina (Cg) em pata de ratos. Desta maneira, parece não restar dúvidas de que a ativação da IL-1 β é importante no

estabelecimento da dor inflamatória por induzir a liberação de prostaglandinas (revisado por POOLE et al., 1999). Embora a administração exógena de PGE_2 induza hiperalgesia semelhante em termos de magnitude e tempo de resposta, àquela induzida por carragenina, a dose necessária para isso (100 ng) é provavelmente centenas de vezes maior que a liberada endogenamente após a administração de carragenina. Mesmo considerando que a carragenina induz a liberação tanto de prostaglandinas quanto de aminas simpáticas, pelo fato da PGE_2 ser exatamente a mesma molécula que a liberada no sítio da inflamação, se levarmos em consideração a dose é improvável que a administração exógena de PGE_2 mimetize a hiperalgesia induzida por agentes inflamatórios.

Mais recentemente (FUNEZ et al., 2008), demonstraram que a administração central (por via i.t.) de $IL-1\beta$ também induz hiperalgesia mecânica, a qual é mediada por PGs. Além disso, também foi demonstrado, pelos mesmos autores, que o pré-tratamento local com indometacina ou morfina na pata inibe, somente na pata ipsilateral, a hiperalgesia mecânica induzida pela administração intratecal de $IL-1\beta$. Estes dados foram interpretados como sendo exemplo de uma atividade da indometacina distante do seu sítio de injeção, sugerindo que a mesma via NAP iniba a COX neuronal no GRD, impedindo a liberação de prostaglandinas no terminal central do NAP. Apesar da especialização funcional que existe nos terminais, durante um processo inflamatório esta célula poderia responder como uma unidade integrada, o que explicaria a inibição periférica da sensibilização induzida por um estímulo central. Outra possibilidade, ainda, seria a de que as PGs poderiam ser liberadas pelo próprio NAP e, atuando de maneira autócrina, levar à sensibilização dos nociceptores a estímulos mecânicos.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a liberação endógena de IL-1 β no GRD participa da hiperalgesia inflamatória. Embora não restem dúvidas que a IL-1 β liberada no tecido periférico atue como um mediador inflamatório e induz também migração de PMN, a IL-1 β liberada no GRD parece estar relacionada mais com atividade neuromodulatória participando da sensibilização dos NNPs. Deste modo experimentos realizados previamente demonstraram que a administração de IL-1 β no GRD induzir hiperalgesia, porém não induziu aumento de neutrófilos no GRD (ARALDI et al., 2007). De modo semelhante, a administração na pata de carragenina ou CFA embora induza hiperalgesia e liberação de IL-1 β no GRD, não induziu migração de neutrófilos para este tecido. Trabalhos realizados por outros grupos também observaram aumento de IL-1 β no GRD e na medula espinal após injúria do nervo periférico (BARTHOLDI; SCHWAB, 1997; DELEO et al., 1997; LI et al., 2005). De maneira semelhante ao GRD, a administração de IL-1 β no espaço sub-aracnóide (intratecal) também induz hiperalgesia (REEVE et al., 2000). Porém é interessante ressaltar que tem sido demonstrado que administrações intratecais promovem a difusão de drogas tanto para as células da medula espinal quanto para as células do GRD (FERRARI et al., 2007).

Embora alguns autores tenham sugerido que o aumento da concentração de IL-1 β no GRD pode estar relacionada com uma possível migração neutrofílica para este tecido (THACKER et al., 2007), nossos dados apontam para uma possível liberação desta citocina por células residentes do GRD, neurônios ou células satélites, uma vez que dados do nosso grupo de pesquisa não demonstraram aumento de MPO no GRD após indução de inflamação no tecido periférico, seja por carragenina, seja por CFA (dados não publicados).

Estes dados embora tenham sido obtidos com tratamentos via intratecal, são bastante semelhantes com os obtidos em nosso trabalho. Outros trabalhos também têm mostrado que a expressão de IL-1 na medula espinal poderia estar relacionada com a sensibilização neuronal e hiperalgesia (FALCHI et al., 2001; REEVE et al., 2000; SUNG et al., 2004). De maneira oposta, o bloqueio da ação da IL-1 β na medula espinal por anticorpos ou com o antagonista do receptor para IL-1 (IL-1Ra), previne e/ou reverte a hiperalgesia e a alodinia induzidas pela inflamação periférica (SAMAD et al., 2001; TADANO et al., 1999) e reduz os níveis de RNAm para COX-2 espinal após administração periférica de CFA (SAMAD et al., 2001).

Para demonstrar a participação da IL-1 β do GRD na hiperalgesia inflamatória do tecido periférico utilizamos duas estratégias: 1^o) administração ganglionar (no GRD-L5); e 2^o) análise das proteínas envolvidas na sinalização intracelular do receptor IL-1R1 em células do GRD. Com relação à administração intraganglionar no GRD-L5 uma crítica que poderia ser feita é o fato de tanto o GRD-L5 quanto o GRD-L4 compartilharem do mesmo campo somestésico periférico, embora nossos dados demonstrem que a administração de indometacina apenas no GRD-L5 é suficiente para inibir completamente a hiperalgesia induzida por IL-1 β na pata. Esta aparente contradição pode ser explicada pelo fato dos neurônios oriundos do GRD-L5 e GRD-L4 convergirem para um mesmo neurônio secundário, provavelmente do tipo WDR (TAKAHASHI; NAKAJIMA, 1996). Com o objetivo de demonstrar que a inibição da hiperalgesia na pata, pela administração de indometacina apenas no GRD-L5, está relacionada, pelo menos em parte, com esta provável convergência neuronal na medula espinal, iniciamos uma série de experimentos. Neste trabalho descrevemos um experimento demonstrando que a administração de lidocaína 2% no GRD-L5 eleva

significativamente o limiar nociceptivo no campo periférico onde administramos nossos estímulos inflamatórios. Também demonstramos que múltiplas administrações de lidocaína 2% no GRD-L5 não alteram o limiar de resposta nociceptivo mecânico mostrando que este procedimento não provoca lesões significativas nas células do GRD.

Outro recurso utilizado neste trabalho foi a administração intraganglionar de ODN antisense contra IL-1RI. Este tratamento permitiu diminuir a expressão desta proteína apenas no NAP e em células satélites, preservando a expressão nas células residentes do tecido periférico. Com este recurso podemos demonstrar o papel da ativação dos receptores IL-1RI neuronais na hiperalgesia inflamatória. Estando de acordo, nosso resultado demonstra que o receptor IL-1RI é importante para o estabelecimento da hiperalgesia inflamatória, já que o tratamento, por via ganglionar, com ODN-AS contra o receptor IL-1RI reduziu a instalação da hiperalgesia mecânica induzida por CFA, Carragenina, IL-1 β , mas não pela PGE₂. Esse nosso dado pode ser reforçado por Song et al., (2009) onde eles observaram que a administração de ODN-AS contra IL-1RI, por via intratecal, apresenta um efeito significativo, anti-hiperalgésico em ratos com dor inflamatória, sugerindo que a IL-1 β endógena na medula espinal participa da hiperalgesia térmica induzida por carragenina.

Também podemos observar que a inibição da expressão de proteína IL-1RI foi inferior à inibição da hiperalgesia demonstrada. Contudo, é importante ressaltar que tem sido sugerido que a diminuição da expressão protéica no GRD por ação de ODN antisense induz uma significativa diminuição do tráfego desta proteína para os terminais neuronais no tecido periférico (PARADA et al., 2003). Isto faz que a quantidade de proteína expressa nos terminais nociceptivos podem ser bem inferiores que as

expressas no GRD. O fato de termos utilizado ODN-AS não-modificado, cuja alta susceptibilidade à degradação por nucleases está vastamente descrita na literatura, no sistema nervoso (no GRD) os ODN-ASs não-modificados são estáveis o suficiente para produzir o efeito de *knock-down* (STONE; VULCHANOVA, 2003; PARADA et al., 2003), inferior quando comparado ao efeito observado no tecido periférico. Isto provavelmente ocorre em função da reduzida atividade de nucleases no SNC quando comparado aos tecidos periféricos ou ao sangue (STONE; VULCHANOVA, 2003).

Embora os dados deste trabalho sugiram fortemente que o receptor IL-1RI é importante no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, o fato do ODN-AS diminuir a expressão de IL-1RI tanto no GRD, quanto nos terminais periféricos e centrais, não exclui a possibilidade da ativação dos receptores IL-1RI nos terminais centrais fossem importantes para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Contudo, não está claro se receptores pré-sináptico de IL-1 β teriam alguma participação retrógrada na hiperalgesia. O fato do tratamento com ODN antisense ter sido feito no GRD e não por via intratecal (SONG et al., 2009) exclui a possibilidade de diminuição dos receptores nos neurônios secundários. Para investigar a importância da ativação de IL-1RI no GRD, além da administração intraganglionar de IL-1Ra, também verificamos a ativação de IRAK-1 e IRAK-4 que têm sido descritas como participar da sinalização intracelular deste receptor.

A via de sinalização da IL-1 β compreende a ativação de diferentes proteínas após a sua ligação ao receptor do tipo I (IL-1RI). Este complexo, que inclui a proteína acessória do receptor de IL-1 (ILRAcP), recruta uma molécula adaptadora, a MyD88, que então se liga à quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK). Até o momento foram identificados 4 membros desta família de quinases: duas ativas, a IRAK-1 e

IRAK-4 e duas inativas, a IRAK-2 e IRAK-M. A primeira desta família, IRAK-1 foi clonada por Cao et al. (1996), e estes mesmos autores demonstraram que sua ativação ocorria no complexo IL-1R-IL-1RAcP-MyD88. Uma vez ativada, a IRAK-1 deixa o complexo receptor de IL-1 e interage com o adaptador TRAF6, que então leva à ativação de duas principais vias de sinalização da IL-1: as MAPK e o fator de transcrição NF- κ B. Deste modo, a expressão de IRAK-1 e IRAK-4 sinaliza a ativação do receptor de IL-1 β . Neste sentido, utilizamos a expressão destas proteínas no método de fluorescência para tentarmos identificar as células envolvidas na ativação da IL-1 β e conseqüente aumento da síntese e liberação da COX-2 envolvida no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória do tecido periférico.

Dados apresentados neste trabalho demonstram que embora a expressão da IRAK-1e IRAK-4 nos neurônios sensoriais seja mais evidente, existe marcação para estas proteínas nas células satélites. O papel da ativação de receptores IL-1RI nestas células, ainda não está bem esclarecido, porém tem sido demonstrado que ambas IL-1RI e IL-1 β , coexistem em neurônios sensoriais e células da glia de ratos normais (controles) tratados com salina. A expressão combinada de IL-1 β e o receptor tipo I (IL-1RI) sugerem uma sinalização autócrina ou parácrina da IL-1 β em neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (LI et al. 2005). Uma possível explicação para estes dados seria a ativação do receptor neuronal (TRPV-1 positivos) envolvida na síntese de prostaglandinas e a ativação dos receptores IL-1RI envolvidos no controle da liberação de IL-1 β (retroalimentação negativa). Outro trabalho demonstrou através de RT-PCR e hibridização *in situ* a expressão de IL-1RI, mas não de IL-1RII, em neurônios, ao invés de em torno das células satélites presentes nos gânglios da raiz dorsal de ratos (OBREJA et al., 2002), o que está de acordo com nossos dados. Os presentes

resultados demonstram que a expressão das proteínas IRAK-1 e IRAK-4 é majoritariamente em células neuronais, embora vimos a ativação destas proteínas em células não-neuronais, o que também está de acordo com Obreja et. al. (2002).

Parece não restar dúvidas que a ativação de IL-1RI no tecido periférico é importante para o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória, por induzir a liberação de prostaglandinas. Contudo, os dados deste trabalho sugerem que além da ativação dos receptores IL-1RI no GRD, a ativação destes nos terminais nociceptivos periféricos também poderia participar do desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória.

Parada et al., (2003) visando entender melhor as mudanças na biologia das células de fibras nervosas nociceptivas que contribuem para os sintomas da dor patológica, demonstrou que a ativação de alguns receptores neuronais, tal como o TNFRI, embora não induzam hiperalgesia, aumentam a susceptibilidade destes para mediadores hiperalgésicos, como a PGE₂. Este fenômeno foi originalmente descrito como “*priming*” hiperalgésico. Embora a ativação de TNFRI induza um “*priming*” hiperalgésico tardio e que se prolonga por semanas, neste trabalho verificamos se a ativação de IL-1RI induz um “*priming*” hiperalgésico agudo que promove o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. Neste “*priming*” agudo, a IL-1 β (0,5 pg/50 μ L) foi co-administrada com a dose sub-limiar de PGE₂ (10 ng/pata) em ratos pré-tratados com indometacina na pata e demonstramos que a administração periférica de IL-1 β embora não tenha induzido hiperalgesia devido à inibição da liberação de PGs pela indometacina, significativamente aumentou a susceptibilidade dos NNP (“*priming*”) à ação da PGE₂ sub-limiar, a qual induziu a hiperalgesia com uma magnitude semelhante à dose de 100 ng. Isso demonstra que a ativação do receptor IL-1RI pela IL-1 β , embora não sensibilize os NNP por si só, é fundamental para o desenvolvimento

da hiperalgesia induzida pela prostaglandina liberada endógenamente durante a inflamação do tecido periférico (“*priming*” hiperalgésico). Similarmente à ação da IL-1 β como mediador inflamatório do tecido periférico, com a função de neuromodulação no GRD, a IL-1 β também induz a liberação de prostaglandinas. A administração de indometacina no GRD-L5 preveniu completamente o desenvolvimento do “*priming*” hiperalgésico induzido pela IL-1 β no tecido periférico, o que não foi observado quando administramos a indometacina intraperitonealmente, que reduziu de forma singela o “*priming*” hiperalgésico e esse efeito, deve ter sido devido à ação da mesma, sistemicamente, no GRD.

Verificamos também, nesse estudo, que além da ativação dos receptores IL-1RI neuronais do tecido periférico, a ativação dos receptores IL-1RI do GRD é importante para o “*priming*” hiperalgésico. O tratamento com ODN-AS contra IL-1RI ou IL-1Ra no GRD-L5 inibiu o “*priming*” hiperalgésico, revelado pela administração da dose sub-limiar de PGE₂ (10 ng/pata). Observamos que a inibição do “*priming*” hiperalgésico pelo IL-1Ra foi menor quando comparada a inibição do ODN-AS contra IL-1RI e isso, pode ser explicado pelo fato de que, o antagonista (IL-1Ra) administrado no GRD estaria agindo apenas nas células do GRD enquanto que, o tratamento de 4 dias com ODN-AS contra o receptor IL-1RI estaria agindo nos receptores tanto dos neurônios sensoriais do GRD quanto do terminal neuronal periférico.

6. CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo sugerem que a sensibilização dos NNPs pelas prostaglandinas depende da ativação de receptores neuronais de IL-1 β nos terminais periféricos os quais, por sua vez, induzem a liberação de IL-1 β no GRD a qual atua como neuromoduladora via liberação de PGs pelas células neuronais. Esta seqüência de eventos parece ser fundamental para a sensibilização dos NNP durante os processos inflamatórios do tecido periférico (**Figura 17**). Este fato novo envolvido no mecanismo periférico da dor inflamatória emerge como uma nova linha de estudos envolvendo o papel do GRD e suas células no desenvolvimento da sensibilização periférica e abre novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos mais seguros para o controle da dor de origem inflamatória.

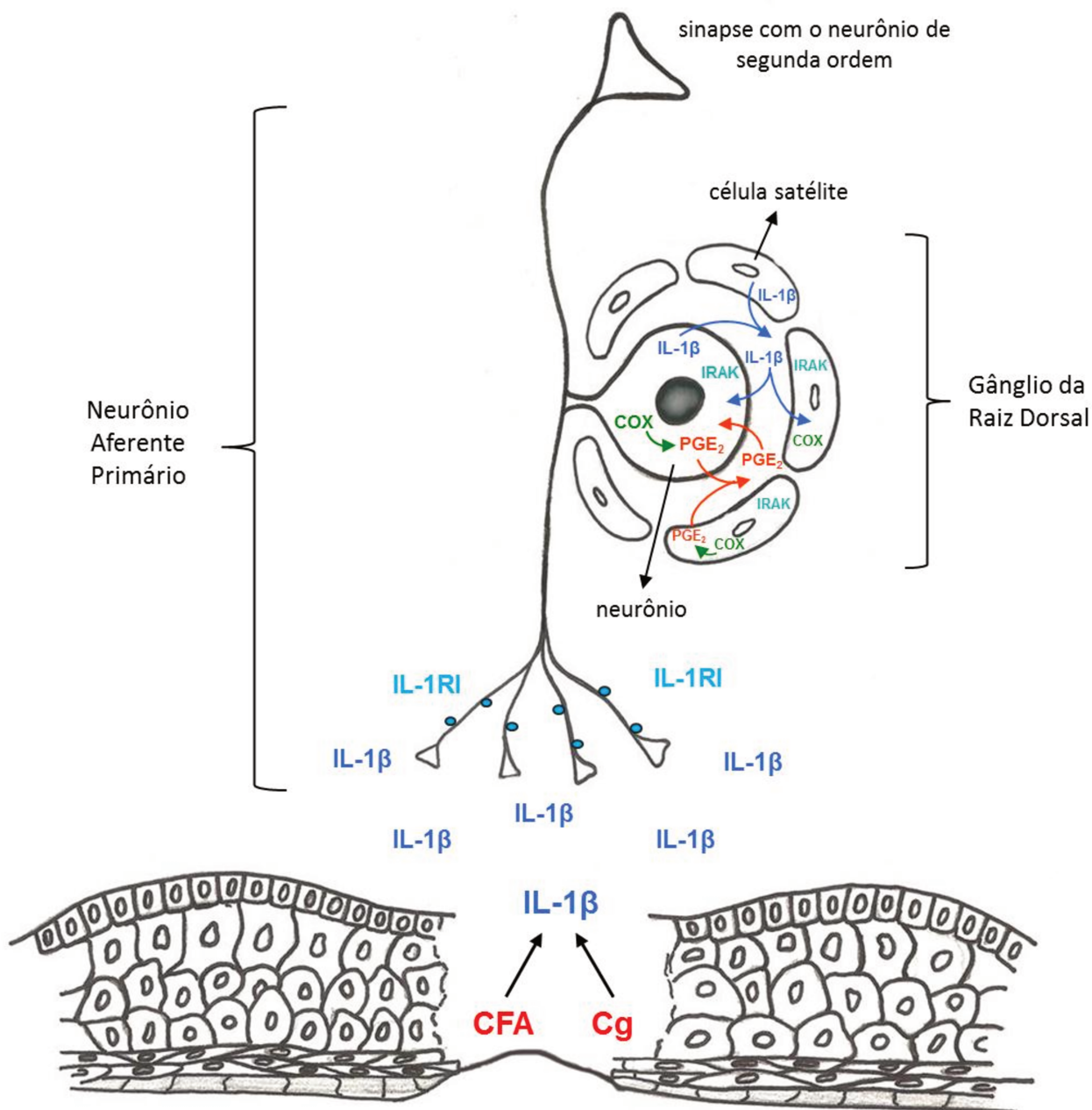


Figura 17. Esquema propondo a participação das células do GRD na sensibilização dos Neurônios Nociceptivos Primários durante inflamação do tecido periférico. IL-1 β liberada no tecido periférico age no receptor IL-1RI neuronal induzindo a liberação de IL-1 β no GRD, a qual age em receptores IL-1RI através da ativação IRAK-1 e IRAK-4 no próprio neurônio e/ou em células satélites. Subsequente à liberação de IL-1 β , ocorre ativação de COX em neurônios TRPV-1⁺ e/ou em células satélites com consequente síntese de prostaglandinas, as quais agem nos neurônios TRPV-1⁺ sensibilizando-os. CFA (Adjuvante Completo de Freund), Cg (Carragenina), IL-1 β (Interleucina-1 β), IL-1RI (Receptor de Interleucina-1 do Tipo I), IRAK (proteínas quinases, IRAK-1 e IRAK-4), COX (Ciclooxigenase-2), PGE₂ (Prostaglandina-E₂).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. **Neurol Sci**, v.24 Suppl 2, p.S57-60, 2003.

ALEY K. O.; R. O. MESSING; D. MOCHLY-ROSEN; J. D. LEVINE. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **J Neurosci**, v. 20, p. 4680-4685, Jun 15, 2000, n. 12.

ARALDI, D. O papel dos neurônios aferentes primários na síntese e liberação de prostaglandina-E₂ no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. **Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, p. 1-122, 2007. Mestrado – Universidade de São Paulo.

BARTHOLDI, D.; M. E. SCHWAB. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an *in situ* hybridization study. **Eur J Neurosci**, v. 9, p. 1422-38, Jul, 1997. n. 7.

BATTAGLIA, G.; A. RUSTIONI. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **J Comp Neurol**, n.2, p.302-12, 1988, v.277.

BESSON, J.M.; A. CHAOUCH. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev**, v.67, p.67-186, 1987, n.1.

BIANCHI, M.; B. DIB; A. E. PANERAI. Interleukin-1 and nociception in the rat. **J Neurosci Res**, v. 53, p. 645-50, Sep 15, 1998. n. 6.

BIANCHI, M.; P. SACERDOTE; L. LOCATELLI; P. MANTEGAZZA; A. E. PANERAI. Corticotropin releasing hormone, interleukin-1 alpha, and tumor necrosis factor-alpha share characteristics of stress mediators. **Brain Res**, v. 546, p. 139-42, Apr 12, 1991. n. 1.

BLASI, F.; M. RICCIO; A. BROGI; M. STRAZZA; M. L. TADDEI; S. ROMAGNOLI; A. LUDDI; R. D'ANGELO; S. SANTI; E. COSTANTINO-CECCARINI; M. MELLI. Constitutive expression of interleukin-1beta (IL-1beta) in rat oligodendrocytes. **Biol Chem**, v. 380, p. 259-64, Feb, 1999. n. 2.

BONICA, J.J. **The management of pain**. 2ed. Philadelphia, 1990.

BRAZ, D. Efeito Hipernociceptivo periférico induzido pela administração intratecal de Interleucina-1 β . **Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, p. 1-84, 2003. Mestrado - Universidade de São Paulo.

CAMPBELL, W. B.; P. V. HALUSHKA. Lipid-derived autacoids: Eicosanoids and platelet-activating factor. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., *et al* (Ed.). **Goldman e**

Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. International Edition: McGraw-Hill, 1996. p. 601 - 606.

CAO, Z.; W. J. HENZEL; X. GAO. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. **Science**, v.271, p.1128-31, Feb 23, 1996. n.5252.

COPRAY, J. C.; I. MANTINGH; N. BROUWER; K. BIBER; B. M. KUST; R. S. LIEM; I. HUITINGA; F. J. TILDERS; A. M. VAN DAM; H. W. BODDEKE. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **J Neuroimmunol**, v. 118, p. 203-11, Aug 30, 2001. n. 2.

CUNHA, T. M.; W. A. VERRI, JR.; J. S. SILVA; S. POOLE; F. Q. CUNHA; S. H. FERREIRA. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 1755-60, Feb 1, 2005. n. 5.

DAVIES, C. A.; S. A. LODDICK; S. TOULMOND; R. P. STROEMER; J. HUNT; N. J. ROTHWELL. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 19, p. 87-98, Jan, 1999. n. 1.

DELEO, J. A.; R. W. COLBURN; A. J. RICKMAN. Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. **Brain Res**, v. 759, p. 50-7, Jun 6, 1997. n. 1.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v.Suppl 6, p.S27-35, 1999.

DEVOR, M.; M. OBERMAYER. Membrane differentiation in rat dorsal root ganglia and possible consequences for back pain. **Neurosci Lett**, v.51, Oct 26, p.341-6. 1984, n.3.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-147, Mar 15, 1996. n. 6.

DOU, W.; Y. JIAO; S. GOORHA; R. RAGHOW; L. R. BALLOU. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.74, p.29-43, Oct, 2004. n.1-4

ENGLAND, S.; S. BEVAN; R. J. DOCHERTY. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J Physiol**, v.495 (Pt 2), p.429-40, 1996.

EVANS, A. R.; H. JUNGER; M. D. SOUTHALL; G. D. NICOL; L. S. SORKIN; J. T. BROOME; T. W. BAILEY; M. R. VASKO. Isoprostanes, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons. **J Pharmacol Exp Ther**, v.293, Jun, p.912-20. 2000, n.3.

FALCHI, M.; F. FERRARA; C. GHARIB; B. DIB. Hyperalgesic effect of intrathecally administered interleukin-1 in rats. **Drugs Exp Clin Res**, v. 27, p. 97-101, 2001. n. 3.

FERRARI, L. F.; F. Q. CUNHA; C. A. PARADA; S. H. FERREIRA. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. **J Neurosci Methods**, v. 159, p. 236-43, Jan 30, 2007. n. 2.

FERREIRA S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol** v. 240, p. 200-203, 1972.

FERREIRA S. H. Inflammation, prostaglandins and aspirin-like drugs. **Trans Med Soc Lond** v. 89, p. 20-31, 1973.

FERREIRA S. H., B. B. LORENZETTI. Intrathecal administration of prostaglandin E2 causes sensitization of the primary afferent neuron via the spinal release of glutamate. **Inflamm Res**, v. 45 p. 499-502, 1996.

FERREIRA, S. H.; B. B. LORENZETTI; A. F. BRISTOW; S. POOLE. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, p. 698-700, Aug 25, 1988. n. 6184.

FERREIRA S. H., B. B. LORENZETTI, S. POOLE. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 110, p.1227-1231, 1993.

FERREIRA, S. H.; J. R. VANE. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v. 216, p. 868-73, Dec 2, 1967. n. 5118.

FERREIRA S. H.; M. NAKAMURA; M. S. DE ABREU CASTRO. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 16, p. 31-37, Jul, 1978, n. 1.

FRANCISCHI, J. N.; C. T. CHAVES; A. C. MOURA; A. S. LIMA; O. A. ROCHA; D. L. FERREIRA-ALVES; Y. S. BAKHLE. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 137, p. 837-44, Nov, 2002. n. 6.

FUNEZ, M. I.; L. F. FERRARI; D. B. DUARTE; D. SACHS; F. Q. CUNHA; B. B. LORENZETTI; C. A. PARADA; S. H. FERREIRA. Teleantagonism: A pharmacodynamic property of the primary nociceptive neuron. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, p.19038-43, Dec 9, 2008. n.49.

GHILARDI, J. R.; C. I. SVENSSON; S. D. ROGERS; T. L. YAKSH; P. W. MANTYH. Constitutive spinal cyclooxygenase-2 participates in the initiation of tissue injury-induced hyperalgesia. **J Neurosci**, v. 24, p. 2727-32, Mar 17, 2004. n. 11.

GOLD, M.S.; J. D. LEVINE; A. M. CORREA. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J Neurosci**, v.18, p.10345-55, 1998, n.24.

GOSSET, M.; F. BERENBAUM; A. LEVY; A. PIGENET; S. THIRION; J. L. SAFFAR; C. JACQUES. Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene. **Arthritis Res Ther**, v.8, p.R135, 2006, n.4.

HAY, C.; J. DE BELLEROCHÉ. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. **Neuroreport**, v. 8, p. 1249-51, Mar 24, 1997. n. 5.

HUANG, J.; X. ZHANG; P. A. MCNAUGHTON. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. **Curr Neuropharmacol**, v.4, p.197-206, 2006, n.3.

IGWE, O. J.; L. NING. Regulation of the second-messenger systems in the rat spinal cord during prolonged peripheral inflammation. **Pain**, v.58, Jul, p.63-75, 1994. n.1.

INOUE, A.; K. IKOMA; N. MORIOKA; K. KUMAGAI; T. HASHIMOTO; I. HIDE; Y. NAKATA. Interleukin-1 β induces substance P release from primary afferent neurons through the cyclooxygenase-2 system. **J Neurochem**, v. 73, p. 2206-13, Nov, 1999. n. 5.

JENSEN, K.; H. O. ANDERSEN; J. OLESEN; U. LINDBLOM. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, v. 25, p. 313-23, Jun, 1986. n. 3.

JI, G. C.; Y. Q. ZHANG; F. MA; G. C. WU. Increase of nociceptive threshold induced by intrathecal injection of interleukin-1 β in normal and carrageenan inflammatory rat. **Cytokine**, v. 19, p. 31-6, Jul 7, 2002. n. 1.

JU, G.; T. HOKFELT; E. BRODIN; J. FAHRENKRUG; J. A. FISCHER; P. FREY; R. P. ELDE; J. C. BROWN. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. **Cell Tissue Res**, v.247, p.417-31, 1987, n.2.

JULIUS, D.; A.I. BASBAUM. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-10, 2001, n.6852.

KHASAR, S. G.; A. K. OUSEPH; B. CHOU; T. HO; P. G. GREEN; J. D. LEVINE. Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat hindpaw? **Neuroscience**, v.64, p.1161-5, Feb, 1995. n.4.

KIS, B.; J. A. SNIPES; D. W. BUSIJA. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **J Pharmacol Exp Ther**, v.315, Oct, p.1-7. 2005, n.1.

KOERBER, H. R.; K. MIRNICS; P. B. BROWN; L. M. MENDELL. Central sprouting and functional plasticity of regenerated primary afferents. **J Neurosci**, v.14, p.3655-71, 1994, n.6.

KOHAMA, I.; K. ISHIKAWA; J.D. KOCSIS. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. **J Neurosci**, v.20, p.1538-49, 2000, n.4.

KUHN, D. C.; A. L. WILLIS. Proceedings: Prostaglandin E2, inflammation and pain threshold in rat paws. **Br J Pharmacol**. v.49, Sep, p.183-184, 1973, n.1.

LAI, J.; M. S. GOLD; C. S. KIM; D. BIAN; M. H. OSSIPOV; J. C. HUNTER; F. PORRECA. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. **Pain**, v. 95, p. 143-52, Jan, 2002. n. 1-2.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-5, Aug 15, 1970. n.5259.

LEE, K. M.; B. S. KANG; H. L. LEE; S. J. SON; S. H. HWANG; D. S. KIM; J. S. PARK; H. J. CHO. Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Eur J Neurosci**, v. 19, p. 3375-3381, 2004. n. 12.

LI, M.; J. SHI; J. R. TANG; D. CHEN; B. AI; J. CHEN; L. N. WANG; F. Y. CAO; L. L. LI; C. Y. LIN; X. M. GUAN. Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1beta and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26, p. 192-8, Feb, 2005. n. 2.

MA, Q. P.; C. J. WOOLF. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat. **Pain**, v. 67, p. 307-316, Oct, 1996, n.2-3.

MA, W.; J.C. EISENACH. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. **Eur J Neurosci**, v.15, p.1037-47, 2002, n.6.

MCMAHON, S.; M. KOLTZENBURG. The changing role of primary afferent neurones in pain. **Pain**, v.43, p.269-72, 1990a, n.3.

MCMAHON, S. B.; M. KOLTZENBURG. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci**, v. 13, p. 199-201, Jun, 1990b. n. 6.

MICHAEL, G. J.; S. AVERILL; A. NITKUNAN; M. RATTRAY; D. L. BENNETT; Q. YAN; J. V. PRIESTLEY. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. **J Neurosci**, v.17, p.8476-90, 1997, n.21.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, p.1-164, 1999, n.1.

MILNE, R.J.; R. D. FOREMAN; G. J. GIESLER; W. D. Jr. WILLIS. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. **Pain**, v.11, p.163-83, 1981, n.2.

MIZUSHIMA, T.; K. OBATA; H. KATSURA; J. SAKURAI; K. KOBAYASHI; H. YAMANAKA; Y. DAI; T. FUKUOKA; T. MASHIMO; K. NOGUCHI. Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinase 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321, p. 28-34, Apr, 2007. n. 1.

MOLLER, K. A.; B. JOHANSSON; O. G. BERGE. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **J Neurosci Methods**, v. 84, p. 41-7, Oct 1, 1998. n. 1-2.

NAKAMURA, H.; K. NAKANISHI; A. KITA; T. KADOKAWA. Interleukin-1 induces analgesia in mice by a central action. **Eur J Pharmacol**, v. 149, p. 49-54, Apr 27, 1988. n. 1-2.

NANTEL, F.; D. DENIS; R. GORDON; A. NORTHEY; M. CIRINO; K. M. METTERS; C. C. CHAN. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 128, p. 853-9, Oct, 1999. n. 4.

NARUMIYA, S.; Y. SUGIMOTO; F. USHIKUBI. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiological reviews**, v. 79, p. 1193-1226, 1999, n. 4.

NOBACK, C.R.; N. L. STROMINGER; R. J. DEMAREST. **The human nervous system structure and function**. 5^a ed. New York: Williams & Wilkins, 1996, 123-37.

OBREJA, O.; P. K. RATHEE; K. S. LIPS; C. DISTLER; M. KRESS. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 1497 – 503, Oct, 2002, n. 12.

OKA, T.; S. AOU; T. HORI. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats. **Brain Res**, v. 624, p. 61-8, Oct 8, 1993. n. 1-2.

PARADA, C. A.; D. B. REICHLING; J. D. LEVINE. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain**, v.113, p.185-90, Jan, 2005. n.1-2.

PARADA, C. A.; J. J. YEH; D. B. REICHLING; J. D. LEVINE. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. **Neuroscience**, v.120, p.219-26. 2003. n.1.

PARADA, C. A.; J. J. YEH; E. K. JOSEPH; J. D. LEVINE. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. **Eur J Neurosci**, v.17, p.1847-52, May, 2003. n.9.

PEARSON, V. L.; N. J. ROTHWELL; S. TOULMOND. Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. **Glia**, v. 25, p. 311-23, Feb 15, 1999. n. 4.

POOLE, S.; F. Q. CUNHA; S. SELKIRK; B. B. LORENZETTI; S. H. FERREIRA. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br J Pharmacol**, v. 115, p.684-688, Jun, 1995, n.4.

POOLE, S.; F. Q. CUNHA; S. H. FERREIRA. Hyperalgesia from subcutaneous cytokine. **Cytokines and Pain**, 59-87, 1999.

PORRECA, F.; J. LAI; D. BIAN; S. WEGERT; M. H. OSSIPOV; R. M. EGLIN; L. KASSOTAKIS; S. NOVAKOVIC; D. K. RABERT; L. SANGAMESWARAN; J. C. HUNTER. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.96, p.7640-4, 1999, n.14.

PRADO, W.A. **Medicamentos analgésicos de ação central**. São Paulo: Atheneu, 1999. 175-195.

RAMOS, C. D.; C. CANETTI; J. T. SOUTO; J. S. SILVA; C. M. HOGABOAM; S. H. FERREIRA; F. Q. CUNHA. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. **J Leukoc Biol**, v. 78, p. 167-77, Jul, 2005. n. 1.

REEVE, A. J.; S. PATEL; A. FOX; K. WALKER; L. URBAN. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. **Eur J Pain**, v. 4, p. 247-57, 2000. n. 3.

RIEDEL, W.; G. NEECK. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v.60, p.404-15, 2001, n.6.

ROTHWELL, N. J.; G. N. LUHESHI. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends Neurosci**, v. 23, p. 618-25, Dec, 2000. n. 12.

SAMAD, T. A.; K. A. MOORE; A. SAPIRSTEIN; S. BILLET; A. ALLCHORNE; S. POOLE; J. V. BONVENTRE; C. J. WOOLF. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-5, Mar 22, 2001. n. 6827.

SCHAIBLE, H.G.; R. F. SCHMIDT. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J Neurophysiol**, v.60, p.2180-95, 1988, n.6.

SCHWEIZER, A.; U. FEIGE; A. FONTANA; K. MULLER; C. A. DINARELLO. Interleukin-1 enhances pain reflexes. Mediation through increased prostaglandin E2 levels. **Agents Actions**, v. 25, p. 246-51, Dec, 1988. n. 3-4.

SEITZ, R.; J. LOHLER; G. SCHWENDEMANN. Ependyma and meninges of the spinal cord of the mouse. A light-and electron-microscopic study. **Cell Tissue Res**, v.220, p.61-72. 1981, n.1.

SHINDER, V.; M. DEVOR. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. **J Neurocytol**, v.23, p.515-31, 1994, n.9.

SIMMONS, D. L., R. M. BOTTING.; T. HLA. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v. 56, p. 387-437, 2004.

SIMS, J. E.; S. L. PAINTER; I. R. GOW. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. **Cytokine**, v. 7, p. 483-90, Aug, 1995. n. 6.

SMITH, C.H.; J. N. BARKER; R. W. MORRIS; D. M. MACDONALD; T. H. LEE. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **J Immunol**, v.151, p.3274- 82, 1993, n.6.

SOIGNIER, R. D.; B. K. TAYLOR; B. A. BAIAMONTE; F. A. LEE; D. PAUL; H. J. GOULD 3rd. Measurement of CFA-induced hyperalgesia and morphine-induced analgesia in rats: dorsal vs plantar mechanical stimulation of the hindpaw. **Pain Med**, v.12, Mar, p.451-8, 2011, n.3.

SONG, M. J.; Y. Q. WANG; G. C. WU. Additive anti-hyperalgesia of electroacupuncture and intrathecal antisense oligodeoxynucleotide to interleukin-1 receptor type I on carrageenan-induced inflammatory pain in rats. **Brain Res Bull**, v.78, p.335-41, Mar 30, 2009. n.6.

SOUTER, A. J.; M. G. GARRY; D. L. TANELIAN. Spinal interleukin-1beta reduces inflammatory pain. **Pain**, v. 86, p. 63-8, May, 2000. n. 1-2.

STONE, L. S.; L. VULCHANOVA. The pain of antisense: in vivo application of antisense oligonucleotides for functional genomics in pain and analgesia. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, p. 1081-112, Aug 28, 2003. n. 8.

SUNG, C. S.; Z. H. WEN; W. K. CHANG; K. H. CHAN; S. T. HO; S. K. TSAI; Y. C. CHANG; C. S. WONG. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates interleukin-1beta-induced thermal hyperalgesia and inducible nitric oxide synthase expression in the spinal cord. **J Neurochem**, v. 94, p. 742-52, Aug, 2005. n. 3.

SUNG, C. S.; Z. H. WEN; W. K. CHANG; S. T. HO; S. K. TSAI; Y. C. CHANG; C. S. WONG. Intrathecal interleukin-1 β administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1015, p. 145-53, Jul 23, 2004. n. 1-2.

TADANO, T.; M. NAMIOKA; O. NAKAGAWASAI; K. TAN-NO; K. MATSUSHIMA; Y. ENDO; K. KISARA. Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. **Life Sci**, v. 65, p. 255-61, 1999. n. 3.

TAKAHASHI, Y.; Y. NAKAJIMA. Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. **Pain**, v.67, p.197-202, Sep, 1996. n.1.

TAKTAK, Y. S.; M. LEE. A solid phase enzyme immunoassay for serum amyloid A (SAA) protein. Clinical evaluation. **J Immunol Methods**, v. 136, p. 11-6, Jan 24, 1991. n. 1.

THACKER, M. A.; A. K. CLARK; F. MARCHAND; S. B. MCMAHON. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth Analg**, v. 105, p. 838-47, Sep, 2007. n. 3.

TOUZANI, O.; H. BOUTIN; J. CHUQUET; N. ROTHWELL. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. **J Neuroimmunol**, v. 100, p. 203-15, Dec, 1999. n. 1-2.

TRACEY, D.J.; S. DE BIASI; K. PHEND; A. RUSTIONI. Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. **Neuroscience**, v.40, p.673-86, 1991, n.3.

TRIFAN, O. C.; T. HLA. Cyclooxygenase-2 modulates cellular growth and promotes tumorigenesis. **J Cell Mol Med**, v. 7, p. 207-22, Jul-Sep, 2003. n. 3.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, p. 232-5, Jun 23, 1971. n. 25.

VANEGAS, H.; H. G. SCHAIBLE. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cyclooxygenases] in the spinal cord. **Prog Neurobiol**, v.64, Jul, p.327-63. 2001, n.4.

VERRI, W. A., JR.; T. M. CUNHA; C. A. PARADA; S. POOLE; F. Q. CUNHA; S. H. FERREIRA. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v.112, p.116-38, Oct, 2006. n.1.

VIVANCOS, G. G.; C. A. PARADA; S. H. FERREIRA. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **Br J Pharmacol**, v. 138, p. 1351-7, Apr, 2003. n. 7.

VITKOVIC, L.; J. BOCKAERT; C. JACQUE. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? **J Neurochem**, v. 74, p. 457-71, Feb, 2000. n. 2.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v.23, p.175-266, 1896.

WAGGENER, J. D.; J. BEGGS. The membranous coverings of neural tissues: an electron microscopy study. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.26, Jul, p.412-26, 1967. n.3

WALL, P.D.; R. MELZACK. (Ed) **Textbook of pain**. 4^a ed., UK: Churchill Livingstone, cap. 2 e 3, p. 59-103, 1999.

WESCHE, H.; W. J. HENZEL; W. SHILLINGLAW; S. LI; Z. CAO. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. **Immunity**, v.7, p.837-47, Dec, 1997. n.6.

WILLIS, W.D.; K. N. WESTLUND. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J Clin Neurophysiol**, v.14, p.2-31, 1997, n.1.

WOOD, J. N.; J. P. BOORMAN; K. OKUSE; M. D. BAKER. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. **J Neurobiol.**, v.61, p.55-71, 2004, n.1.

YAMAMOTO, T.; N. NOZAKI-TAGUCHI. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Res**, v. 739, p. 104-10, Nov 11, 1996. n. 1-2.

YAMAMOTO, T.; N. NOZAKI-TAGUCHI. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. **Anesth Analg**, v. 94, p. 962-7, table of contents, Apr, 2002. n. 4.

ZHANG, Y.; A. SHAFFER; J. PORTANOVA; K. SEIBERT; P. C. ISAKSON. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 283, p. 1069-75, Dec, 1997. n. 3.

ZHAO, Z.; S. R. CHEN; J. C. EISENACH; D. W. BUSIJA; H. L. PAN. Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. **Neuroscience**, v.97, p.743-8, 2000. n. 4.

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp

CERTIFICADO

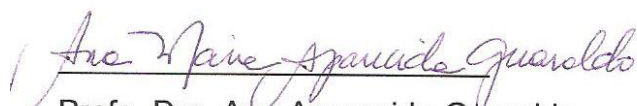
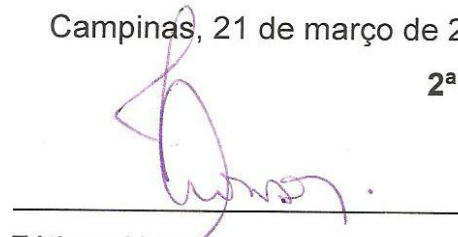
Certificamos que o Protocolo nº 1462-1, sobre "O papel da interleucemia-1beta produzida no gânglio da raiz dorsal no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada / Dionéia Araldi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em 31 de março de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1462-1, entitled "The role of interleukin-1beta produced in the dorsal root ganglion during the development in the inflammatory hyperalgesia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 31, 2008.

Campinas, 21 de março de 2012.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente
Fátima Alonso
Secretária Executiva